



Rôles des interactions interdomaines dans le comportement cellulaire de la protéine CFTR

Julien Micoud

► To cite this version:

Julien Micoud. Rôles des interactions interdomaines dans le comportement cellulaire de la protéine CFTR. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00363323

HAL Id: tel-00363323

<https://theses.hal.science/tel-00363323>

Submitted on 22 Feb 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE Joseph Fourier, Grenoble 1
École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité
Biologie Cellulaire

Présentée par **Julien Micoud**

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Sujet de la thèse

Rôles des interactions interdomaines dans le comportement
cellulaire de la protéine CFTR

Soutenue publiquement le 2 Juillet 2008

Composition du jury :

Prof. Frédéric BECQ
Dr. Attilio DI PIETRO
Dr. Marc CHANSON
Prof. Michel ROBERT-NICOUD
Dr. Michel VIVAUDOU
Dr. Mohamed BENHARUGA

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

LABORATOIRE DE CHIMIE ET BIOLOGIE DES METAUX UMR 5249
Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant
Commissariat à l'Energie Atomique CEA-Grenoble

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire puis du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux au CEA-Grenoble. Je tiens à remercier le Docteur Florent Guillain et le Professeur Marc Fontecave pour m'avoir accueilli au sein de ces laboratoires.

Je remercie particulièrement le Professeur Frédéric Becq et le Docteur Attilio Di Pietro qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce manuscrit et de toute l'attention qu'ils ont portée à sa lecture.

Je remercie également les Docteurs Michel Vivaudou et Marc Chanson ainsi que le Professeur Michel Robert-Nicoud qui ont accepté d'être membre de mon jury.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Docteur Mohamed Benharouga pour son encadrement pendant toutes ces années et pour la confiance qu'il m'a toujours témoigné malgré les difficultés expérimentales rencontrées.

Ce travail de thèse a pu être réalisé grâce au financement de l'association Vaincre La Mucoviscidose. Je tiens donc à remercier les membres de cette association.

Merci pour tout à Robert.

Merci à Aude et Éric.

Merci à Aurélie, Béatrice, Caroline, Christine, Élodie, Francesca, Heidi, Juliens, Michèle, Patrice, Pierre, Sandrine, Simon, Sylvia et Vincent.

Merci à Éliane, Élisabeth et Joseph.

Sommaire

INTRODUCTION

1

I.	<u>LA SUPERFAMILLE DES TRANSPORTEURS ABC</u>	1
	A. GÉNÉRALITÉS.....	1
	B. LE TRANSPORTEUR ABC TYPIQUE : UNE ORGANISATION STRUCTURALE COMMUNE.....	2
	C. LES TRANSPORTEURS ABC HUMAINS.....	3
	1. LES DIFFÉRENTES SOUS-FAMILLES.....	3
	2. LA RÉSISTANCE AUX DROGUES.....	6
	3. LES MALADIES GÉNÉTIQUES ASSOCIÉES.....	6
II.	<u>DE LA MUCOVISCIDOSE AU GENE <i>cftr</i></u>	8
	A. LA MUCOVISCIDOSE.....	8
	1. HISTORIQUE.....	8
	2. DONNÉES PATHOLOGIQUES SUR LA MUCOVISCIDOSE.....	9
	B. LE GÈNE RESPONSABLE DE LA MUCOVISCIDOSE.....	10
	C. LES DIFFÉRENTES CLASSES DE MUTATIONS.....	11
	D. INCIDENCE DES MUTATIONS SUR LA POPULATION.....	13
	E. L'AVANTAGE SÉLECTIF.....	14
III.	<u>LA PROTÉINE CFTR</u>	15
	A. BIOSYNTÈSE, ADRESSAGE ET DÉGRADATION DE CFTR.....	15
	1. BIOSYNTÈSE ET MATURATION DE CFTR.....	15
	i. GÉNÉRALITÉS SUR LES PROTÉINES MEMBRANAIRES.....	15
	ii. MATURATION DE CFTR.....	15
	2. TRANSPORT INTRACELLULAIRE DE CFTR.....	17
	i. LE TRANSPORT RE-APPAREIL DE GOLGI.....	17
	ii. LE TRANSPORT GOLGI-MEMBRANE PLASMIQUE.....	18
	3. DÉGRADATION DE CFTR.....	18
	i. AU NIVEAU DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE.....	18
	ii. ENDOCYTOSE ET RECYCLAGE DE CFTR.....	19
	4. RÔLE DES PROTÉINES CHAPERONNES.....	21
	i. HEAT SHOCK PROTEIN 70 (HSP70).....	22
	ii. HEAT SHOCK PROTEIN 90 (Hsp90).....	23

iii. LA CALNEXINE.....	23
B. LES FONCTIONS DE CFTR.....	24
1. CFTR EST UN CANAL CHLORURE.....	24
i. LE TRANSPORT EPITHELIAL DES IONS Cl^-	24
ii. CFTR EST UN CANAL CHLORURE.....	25
iii. RÉGULATION DE CFTR.....	26
2. CFTR EST UNE PROTÉINE DE REGULATION.....	28
i. LES CANAUX ORCC.....	29
ii. LES CANAUX ENaC.....	29
iii. LES CANAUX ROMK.....	31
iv. LES AQUAPORINES.....	32
v. LES ÉCHANGES $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$	33
vi. LE TRANSPORT D'ATP.....	34
vii. LES CANAUX CHLORURES CALCIUM-DÉPENDANTS....	35
3. AUTRES FONCTIONS DE CFTR.....	35
i. TRAFIC VÉSICULAIRE ET FUSION DES ENDOSOMES....	35
ii. RÉGULATION DU pH INTRACELLULAIRE.....	35
iii. RÔLE DANS L'INFECTION ET L'INFLAMMATION.....	36
4. CFTR INTERAGIT AVEC D'AUTRES PROTÉINES.....	36
i. INTERACTIONS PAR L'INTERMÉDIAIRE DE LA PARTIE N-TERMINALE.....	36
ii. INTERACTIONS PAR L'INTERMÉDIAIRE DE LA PARTIE C-TERMINALE.....	37
IV. <u>LA PROTÉINE CFTR MUTÉE F508del</u>	40
A. GENERALITES.....	40
B. MATURATION ARTIFICIELLE DE CFTR-F508del.....	41
V. <u>ORGANISATION STRUCTURALE DE CFTR</u>	42
A. LA PARTIE N-TERMINALE.....	43
B. LA PARTIE C-TERMINALE.....	44
C. LES DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES.....	45
D. LE DOMAINE DE RÉGULATION R.....	46
E. LES DOMAINES DE LIAISON AUX NUCLÉOTIDES.....	48
1. GÉNÉRALITÉS SUR LES NBDs.....	48

2. LES NBDs DE CFTR.....	49
3. LE COUPLAGE FONCTIONNEL NBD1-NBD2.....	51
4. RÔLE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DE LA F508.....	53
5. INTERACTIONS INTERDOMAINES ET MATURATION.....	54
VI. <u>LA MUTATION F508del: UN DEFECT DE REPLIEMENT</u>	55
A. REPLIEMENT DES PROTÉINES TRANSMEMBRANAIRES	55
B. REPLIEMENT DE LA PROTÉINE CFTR	57
C. MUTATION F508del ET REPLIEMENT	58

OBJECTIFS

61

MATÉRIEL & MÉTHODES

62

I. <u>BIOLOGIE MOLÉCULAIRE</u>	62
A. SPLICING BY OVERLAP EXTENSION PAR PCR	62
1. PRINCIPE.....	62
2. SPLICING BY OVERLAP EXTENSION.....	62
3. PROTOCOLES UTILISÉS.....	65
B. PLASMIDES UTILISÉS	66
C. MÉTHODES COURANTES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	66
1. PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN.....	66
2. LIGATION.....	67
3. TRANSFORMATION DES BACTÉRIES COMPÉTENTES.....	67
4. PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE.....	68
II. <u>CULTURE CELLULAIRE</u>	68
A. LIGNÉES CELLULAIRES	68
1. LA LIGNÉE BHK-21.....	69
2. LA LIGNÉE COS-7.....	69
B. CONDITIONS DE CULTURE	69
C. REPIQUAGE	69
D. CONGÉLATION	70
III. <u>EXPRESSION DES PROTÉINES RECOMBINANTES</u>	70
A. TRANSFECTIONS STABLES	70

1. TRANSFECTION STABLE AU PHOSPHATE DE CALCIUM....	70
2. SELECTION DES CLONES POSITIFS.....	71
3. CLONAGE PAR DILUTION.....	71
B. TRANSFECTIONS TRANSITOIRES.....	72
IV. <u>TECHNIQUES DE BIOCHIMIE</u>	72
A. EXTRACTION PROTÉIQUE.....	72
B. DOSAGE PROTÉIQUE.....	72
C. DÉTERMINATION DU PROFIL GLYCOSIDIQUE.....	73
D. FIXATION DE L'ATP SUR LES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES.....	74
E. MARQUAGE MÉTABOLIQUE AU S ³⁵	74
1. PRÉSENTATION.....	74
2. PROTOCOLE.....	74
F. THERMOSTABILITÉ.....	76
G. THERMOAGRÉGATION.....	76
H. PROTÉOLYSES MÉNAGÉES A LA TRYPSINE.....	77
1. ISOLATION DES MICROSOMES.....	77
2. PROTÉOLYSE MÉNAGÉE.....	78
3. ORIENTATION DE CFTR PAR RAPPORT A LA BICOUCHE LIPIDIQUE.....	78
I. ÉLECTROPHORÈSE ET IMMUNODÉTECTION.....	78
V. <u>IMMUNOLOCALISATION CELLULAIRE</u>	79
VI. <u>MESURES DE L'ACTIVITÉ CANAL Cl⁻ DE CFTR</u>	80
A. TECHNIQUE D'EFFLUX D'IODURES.....	80
B. TECHNIQUE DE PATCH-CLAMP.....	81
VII. <u>STATISTIQUES</u>	82

RÉSULTATS : PARTIE 1

83

I. <u>OBTENTION DE PROTÉINES CFTR MODIFIÉES POSSÉDANT DES NBDs INVERSÉS, DÉPLACÉS OU SUPPRIMÉS</u>	83
A. DÉFINITION DES FRONTIÈRES DES NBDs.....	83
B. RÉSULTATS DE LA SOE.....	85

1. OBTENTION DES PROTÉINES N _{1/1} , N _{1/1} * et N _{1/-}	86
2. CONSTRUCTION DES PROTÉINES N _{2/2} et N _{-/2}	87
3. LES AUTRES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES.....	87
II. <u>EXPRESSION BASALE DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES</u>	88
A. TRANSFECTIONS TRANSITOIRES.....	89
B. TRANSFECTIONS STABLES.....	91
III. <u>GLYCOSYLATION DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES</u>	93
IV. <u>LOCALISATION DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES</u>	95
V. <u>LES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES LIENT L'ATP</u>	98
VI. <u>FONCTION DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES</u>	99
A. ÉTUDE PAR MESURE DE L'EFFLUX D'IODURES.....	99
B. ÉTUDE PAR PATCH-CLAMP.....	102
VII. <u>BIOSYNTHÈSE DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES</u>	103
VIII. <u>COMPOURTEMENT CELLULAIRE DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES</u>	105
A. STABILITÉ DES FORMES IMMATURES.....	105
B. EFFICACITÉ DE MATURATION DE N _{1/-}	108
IX. <u>STABILITÉ DE LA PROTÉINE CHIMÉRIQUE N_{1/-}</u>	109
X. <u>MATURATION ARTIFICIELLE DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES</u>	110
XI. <u>ÉTUDE DU REPLIEMENT DES PROTÉINES MODIFIÉES</u>	111
A. PAR THERMOAGRÉGATION.....	111
B. PAR THERMOSTABILITÉ.....	115
C. PAR PROTÉOLYSE MÉNAGÉE.....	117
XII. <u>CONCLUSION</u>	120

RÉSULTATS : PARTIE 2 121

I. <u>OBTENTION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES</u>	121
II. <u>PROFIL D'EXPRESSION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES</u>	122
A. TRANSFECTIONS TRANSITOIRES.....	123
B. TRANSFECTIONS STABLES.....	123

III.	<u>GLYCOSYLATION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES</u>	125
IV.	<u>ÉTUDE DE LA CONFORMATION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES PAR PROTÉOLYSE MÉNAGÉE</u>	126
V.	<u>LOCALISATION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES</u>	129
VI.	<u>MATURATION ARTIFICIELLE DES PROTÉINES CFTR MUTÉES</u>	130
VII.	<u>CONCLUSION</u>	131

DISCUSSION	133
------------	-----

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	146
----------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	150
---------------	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS	185
------------------------	-----

ANNEXES	189
---------	-----

Introduction

Introduction

Environ 25% du génome humain codent pour des protéines associées à la membrane plasmique. Ces protéines peuvent être soit périphériques soit transmembranaires (**FIGURE II**).

Les canaux et les transporteurs constituent les deux principales catégories de protéines transmembranaires. Ils assurent et régulent le mouvement moléculaire à travers la bicouche lipidique, flux nécessaire à l'homéostasie cellulaire.

Dans la catégorie des transporteurs, on trouve la plus grande famille de protéines transmembranaires: les transporteurs ABC (pour *ATP Binding Cassette*).

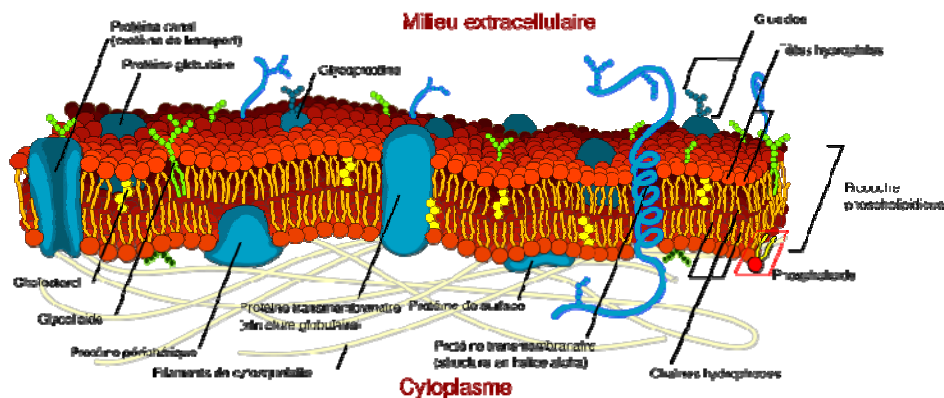


FIGURE II: Schéma représentant la disposition des protéines membranaires par rapport à la membrane plasmique. Cette membrane est organisée en bicouche lipidique. Les phospholipides sont représentés en rouge et orange (tête polaire en rouge et corps hydrophobe en orange), le cholestérol en jaune, les différents types de protéines en bleu et les glycolipides en vert.

VII. LA SUPERFAMILLE DES TRANSPORTEURS ABC

A. GÉNÉRALITÉS

Les transporteurs ABC sont retrouvés en grand nombre dans toutes les espèces. Ce sont des protéines transmembranaires impliquées dans le transport actif de molécules à travers les membranes biologiques. Globalement, leur particularité est de coupler l'énergie libérée par la fixation et l'hydrolyse d'ATP directement au transport de molécules contre leur gradient de concentration [Higgins C.F., 1992]. Ces protéines représentent l'une des plus grandes familles de transporteurs transmembranaires identifiés chez les procaryotes et les eucaryotes inférieurs et supérieurs, et dont les membres semblent dériver d'un seul ancêtre commun [Higgins C.F. *et al.*, 1986]. A ce jour, 69 transporteurs ABC ont été découverts chez *E. coli*, ce qui représente environ 5% de la partie codante de son génome [Linton K.J. & Higgins C.F., 1998], 28 chez *Saccharomyces*, 58 chez *Caenorhabditis*, 51 chez *Drosophila*, 129 chez *Arabidopsis* et environ 50 chez l'Homme [Linton K.J., 2007].

Les transporteurs ABC sont impliqués dans le transport d'une grande variété de substances biologiques (peptides, hormones, sucres, nucléotides, ions,...) et toxiques (métaux lourds, drogues,...). Leur implication dans de nombreuses maladies chez l'Homme et dans les processus de détoxification cellulaire, leur a conféré une grande importance parmi les protéines membranaires [Dean M. *et al.*, 2001a & b].

B. LE TRANSPORTEUR ABC TYPIQUE : UNE ORGANISATION STRUCTURALE COMMUNE

Le transporteur ABC typique est composé de plusieurs domaines associés à la membrane plasmique (**FIGURE 12**). Deux de ces domaines sont très hydrophobes et sont constitués dans la plupart des cas de six segments transmembranaires [Higgins C.F., 1992]. Ils sont appelés domaines transmembranaires (TMDs pour *TransMembrane Domains*). Les deux autres domaines sont localisés à la périphérie de la membrane, fixent l'ATP et couplent son hydrolyse au processus de transport [Higgins C.F., 1992]. Ils sont appelés domaines de liaison aux nucléotides (NBDs pour *Nucleotide Binding Domains*) et ont été très conservés au cours de l'évolution [Higgins C.F. *et al.*, 1986]. En effet, les différents gènes sont classés ou non dans la superfamille des transporteurs ABC en fonction de l'identité de séquence et de l'organisation des NBDs [Higgins C.F. *et al.*, 1986].

Chez les procaryotes, les domaines des transporteurs ABC sont codés par des gènes individuels et exprimés en polypeptides séparés qui doivent par la suite s'assembler pour donner naissance à une protéine fonctionnelle. Au contraire, chez les eucaryotes et en particulier chez l'Homme, un seul gène peut coder pour des polypeptides possédant plusieurs de ces domaines [Hyde S.C. *et al.*, 1990 ; Higgins C.F., 1992]. A l'exception de quelques rares cas, l'unité minimale fonctionnelle pour un transporteur ABC est deux TMDs et deux NBDs.

Le fait que chaque domaine puisse être un polypeptide individualisé mais que l'unité fonctionnelle minimale d'une protéine ABC soit une association de deux TMDs et de deux NBDs implique l'importance des interactions interdomaines. En plus des domaines TMDs et NBDs, certaines protéines ABC possèdent aussi des domaines supplémentaires. Par exemple, CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) possède un domaine R impliqué dans sa régulation [Riordan J.R. *et al.*, 1989].

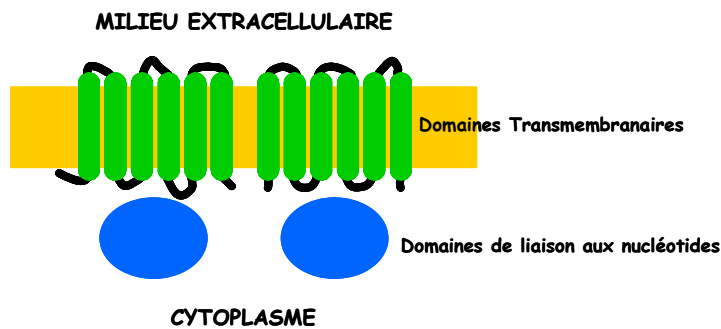


FIGURE I2 : Organisation structurale d'un transporteur ABC typique. Chaque domaine est ici représenté comme un polypeptide individualisé, mais ceux-ci peuvent aussi être fusionnés (voir texte). Chacun des deux segments transmembranaires passe six fois la membrane plasmique. Les NBDs sont localisés à la périphérie de la membrane, dans le cytoplasme de la cellule.

C. LES TRANSPORTEURS ABC HUMAINS

1. LES DIFFÉRENTES SOUS-FAMILLES

A ce jour, une cinquantaine de gènes codant pour des transporteurs ABC ont été découverts chez l'Homme. Les gènes sont dispersés dans tout le génome (presque tous les chromosomes portent un gène ABC) et les transporteurs sont impliqués dans des processus divers et variés, de la régulation de protéines à l'export de drogues. Ces transporteurs peuvent être classés en sept sous-familles, de A à G, en fonction de leur séquence en acides aminés et de leur phylogénie (**TABLEAU I1**) [Dean M. *et al.*, 2001a & b]. L'organisation des domaines peut être très différente en fonction du transporteur. La plupart possède l'organisation structurale commune des ABC, [TMD-NBD]×2. Cependant, on observe aussi des transporteurs organisés soit en un demi-transporteur TMD-NBD dimérisé pour obtenir une protéine fonctionnelle, soit en un NBD unique, la protéine étant alors complètement soluble [Klein I. *et al.*, 1999 ; Dean M. *et al.*, 2001a & b].

Introduction

Protéine ABC	Alias	Localisation	Fonction
ABCA1	ABC1	9q31.1	Efflux de cholestérol dans les HDL
ABCA2	ABC2	9q34.3	Résistance aux drogues
ABCA3	ABC3	16p13.3	Efflux de phosphatidylcholine
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	Efflux de N-rétinylidène-PE
ABCA5		17q24.3	
ABCA6		19p13.3	
ABCA7		17q24.3	
ABCA8		17q24.3	
ABCA9		17q24.3	
ABCA10		17q24.3	
ABCA12		2q34	
ABCA13		7p11-q11	
ABCB1	PGY, MDR	7p21.12	Résistance à de multiples drogues
ABCB2	TAP1	6p21.3	Transport de peptides
ABCB3	TAP2	6p21.3	Transport de peptides
ABCB4	PGY3	7q21.12	Transport de phosphatidylcholine
ABCB5		7p21.1	
ABCB6	MTABC3	2q35	Transport de fer
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	Transport de cluster Fe/S
ABCB8	MABC1	7q36	
ABCB9		12q24.31	
ABCB10	MTABC2	1q42.13	
ABCB11	SPGP	2q24.3	Transport de sels biliaires
ABCC1	MRP1	16p13.12	Résistance aux drogues
ABCC2	MRP2	10q24.2	Efflux d'anions organiques
ABCC3	MRP3	17q21.33	Résistance aux drogues
ABCC4	MRP4	13q32.1	Transport de nucléosides
ABCC5	MRP5	3q27.1	Transport de nucléosides
ABCC6	MRP6	16p13.12	
ABCC7	CFTR	7q31.31	Canal chlorure
ABCC8	SUR	11p15.1	Récepteur aux sulfonylurées
ABCC9	SUR2	12p12.1	Régulateur de canaux K(ATP)
ABCC10	MRP7	6p21.1	
ABCC11		16q12.1	
ABCC12		16q12.1	
ABCD1	ALD	Xq28	Régulateur de transport de VLCFA
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22.1	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	
ABCE1	OABP, RNS4I	4q31.31	Protéine liant l'oligoadénylate
ABCF1	ABC50	6p21.1	
ABCF2		7q36.1	
ABCF3		3q27.1	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	Transport de cholestérol
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	Efflux de toxines, résistance aux drogues
ABCG4	White2	11q23	
ABCG5	White3	2p21	Transport de stérol
ABCG8		2p21	Transport de stérol

TABEAU II : Inventaire des transporteurs ABC humains. Sont indiqués le nom officiel, le nom courant, la localisation chromosomique ainsi que la fonction de chaque transporteur. Modifié d'après Dean M. *et al.*, 2001b.

Introduction

La sous-famille ABCA comprend 12 transporteurs entiers (**TABLEAU II**), qui peuvent être divisés en deux sous-groupes en se basant sur l'analyse phylogénétique et la structure des introns (ABCA1 à 4, ABCA7 et ABCA12 et 13 pour le premier sous-groupe et ABCA5 à 10 pour le deuxième). Les membres les plus étudiés de cette sous-famille sont ABCA1, impliqué dans la biosynthèse de HDL (*High Density Lipoprotein*) et les désordres du cholestérol et ABCA4 (ABCR), impliqué dans le transport de dérivés de la vitamine A au niveau du segment extérieur des photorécepteurs des cônes de la rétine [Allikmets R. *et al.*, 1997].

La sous-famille ABCB, aussi appelée MDR/TAP (*MultiDrug Resistance/Transporter Antigenic Peptides*), est unique aux mammifères et contient à la fois quatre transporteurs entiers et sept demi-transporteurs [Dean M. *et al.*, 2001b]. ABCB1 est le premier transporteur ABC humain à avoir été cloné et caractérisé pour sa capacité à donner un phénotype MDR aux cellules cancéreuses [Ueda K. *et al.*, 1987]. Les demi-transporteurs ABCB, ABCB3 et 9, aussi appelés TAP, sont impliqués dans le transport de peptides dans le réticulum endoplasmique (RE) ou le lysosome lors de la présentation des antigènes dans les molécules HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de type I.

La sous-famille ABCC contient 12 transporteurs entiers impliqués dans des processus très différents, du transport ionique à la sécrétion de toxines. Les membres les plus importants de cette sous-famille sont ABCC7 ou CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), que nous aborderons en détail plus loin, ABCC8 et 9, qui sont des récepteurs aux sulfonylurées et les protéines MRP-like (*MultiResistance Proteins*), impliquées dans le transport de drogues.

La sous-famille ABCD comprend 4 membres codés par 4 gènes. Ces derniers codent pour des demi-transporteurs situés dans le péroxisome et impliqués dans la régulation du transport de longues chaînes d'acides gras.

Les sous-familles ABCE et F contiennent des membres formés uniquement de domaines NBDs, sans les domaines TMDs. Leurs rôles sont divers mais ne sont pas encore très bien caractérisés.

La sous-famille ABCG est composée de six demi-transporteurs inversés, possédant un NBD en position N-terminale et un TMD en position C-terminale. Leurs fonctions sont très diverses, de la régulation du transport de cholestérol (ABCG1) à la résistance aux drogues (ABCG2). Les fonctions de ABCG3 et ABCG4 restent inconnues à ce jour.

2. LA RÉSISTANCE AUX DROGUES

La MDR (*MultiDrug Resistance*) est la principale limitation à la chimiothérapie anti-cancéreuse et certains transporteurs ABC, listés dans le tableau I2, sont fortement impliqués dans ce processus [Dean M. *et al.*, 2001b].

Les cellules exposées à des molécules toxiques peuvent développer des résistances par de nombreux mécanismes, de la diminution de l'import à l'augmentation de l'export en passant par l'augmentation de la détoxification et l'altération des protéines cibles.

La plupart de ces phénomènes peuvent amener au processus de MDR. La cellule devient alors résistante à de nombreuses drogues en plus de la drogue initiale.

Protéine ABC	Alias	Fonction	Problème associé
ABCB1	MDR1	Transport de drogues hydrophobes (Colchicine, Doxorubicin, VP16, Adriamycine, Vinblastine, Digoxine, Saquinivir, Paclitaxel)	
ABCC1	MRP1	Transport de drogues conjuguées (Doxorubicine, Daunorubicine, Vincristine, VP16, Colchicines, Rhodamine).	
ABCC2	MRP2	Transport de drogues conjuguées (Vinblastine, Sulfapyrazone)	Échec de chimiothérapie
ABCC3	MRP3	Transport de drogues conjuguées (Methotrexate, VP16)	
ABCC4	MRP4	Transport de nucléosides conjugués (Nucléosides monophosphates)	
ABCC5	MRP5	Transport de nucléosides conjugués (Nucléosides monophosphates)	
ABCG2	BCP/MXR	Transport de drogues hydrophobes (Mitoxantrone, Topotecan, Doxorubicine, Daunorubicine, CPT-11, Rhodamine)	

TABLERAU I2 : Inventaire des transporteurs ABC Humains impliqués dans la résistance aux drogues. Sont indiqués le nom officiel, le nom courant, la fonction ainsi que le défaut associé. Modifié d'après Dean M. *et al.*, 2001b.

3. LES MALADIES GÉNÉTIQUES ASSOCIÉES

De nombreux transporteurs ABC sont impliqués dans des processus biologiques très importants. Le dysfonctionnement ou l'absence d'une telle protéine peuvent donc entraîner de graves problèmes et donner lieu à des pathologies complexes et sévères. Chez l'Homme, 18 transporteurs ABC impliqués dans des maladies génétiques ont été identifiés [Dean M. *et al.*, 2001].

Introduction

Ces maladies, listées dans le **TABLEAU 13**, sont très variées, du défaut de transport de lipides et de cholestérol (ABCA1) à la mucoviscidose (ABCC7, CFTR), en passant par l'hypoglycémie hyperinsulinémique congénitale (ABCC8, SUR) ou encore la dégénérescence rétinale due à l'âge (ABCA4, ABCR). Dans la grande majorité des cas, ces défauts sont directement liés à des désordres structuraux entraînant une réduction sévère ou une absence totale de fonction.

Gène	Désordre génétique	Maladie complexe
ABCA1	Maladie de Tangier,	Niveau de HDL
ABCA3	hypoalphalipoprotéinémie familiale	
ABCA4	Déficiences en surfactant Stargardt/Fundus flavimaculatus, rétinopathie pigmentaire, dystrophie des cônes et bâtonnets	Dégénération maculaire due à l'âge
ABCA12	Ichtyose lamellaire	
ABCB1	Sensibilité à l'ivermectine	Pompage de digoxine
ABCB2	Déficiences immunitaires	
ABCB3	Déficiences immunitaires	Cholestase intra-hépatique de la grossesse
ABCB4	Cholestase intra-hépatique familiale progressive	
ABCB7	Sidéroblastose liée à X, anémie	
ABCB11	Cholestase intra-hépatique familiale progressive	
ABCC2	Syndrôme de Dubin-Johnson	Pancréatite, bronchectasie
ABCC6	Pseudoxanthome élastique	
ABCC7	Mucoviscidose, absence bilatérale congénitale de vas deferens	
ABCC8	Hypoglycémie hyperinsulinémique persistante familiale de l'enfance	
ABCC9	Cardiomyopathie dilatée avec tachycardie ventriculaire	
ABCD1	Adrénoleukodystrophie	
ABCG5	Sitostérolémie	
ABCG8	Sitostérolémie	

TABLEAU 13 : Inventaire des pathologies associées aux transporteurs ABC humains. Sont indiqués le nom officiel, le désordre génétique et la maladie associée. Modifié d'après Dean M. et *al.*, 2001b.

La superfamille des transporteurs ABC, par l'implication d'un grand nombre de ses membres dans des maladies génétiques et dans les phénomènes de résistance aux drogues, est l'une des familles de protéines les plus étudiées. Parmi les membres de cette superfamille, la protéine CFTR (ABCC7) est certainement le membre le plus étudié. En effet, les mutations identifiées sur le gène *CFTR* sont responsables de la mucoviscidose [Riordan J.R. *et al.*,

1989]. Aujourd'hui de nombreux programmes de recherche sont développés à travers le monde pour trouver la stratégie thérapeutique la plus efficace pour soigner cette pathologie. Ceci passe obligatoirement par l'étude du comportement moléculaire, cellulaire, structural et fonctionnel de la protéine CFTR.

VIII. DE LA MUCOVISCIDOSE AU GENE *CFTR*.

A. LA MUCOVISCIDOSE

1. HISTORIQUE

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas (cystic fibrosis, **CF**, en terminaison anglo-saxonne) est une maladie génétique autosomale récessive extrêmement répandue dans les populations d'origine caucasienne. En France, environ une personne sur 200 est porteuse du gène défectueux et environ un enfant sur 4200 naît atteint de cette maladie. En France, près de 5000 personnes souffrent de la mucoviscidose.

Historiquement, les premières observations de lésions pancréatiques en relation avec la maladie datent du XVI^{ème} siècle. Cependant, jusqu'au XX^{ème} siècle, le diagnostic de la maladie ne put être établi, faute d'une corrélation possible entre les différents symptômes.

En 1936, Fanconi et ses collaborateurs caractérisèrent cette maladie comme une fibrose kystique liée à des bronchiectasies [Fanconi G. *et al.*, 1936]. Mais Andersen fût la première à utiliser le terme fibrose kystique du pancréas pour désigner la maladie [Andersen D.H., 1938]. Le terme mucoviscidose (mucus visqueux) fût introduit pour la première fois par Farber pour contrebalancer la définition d'Andersen uniquement basée sur l'anatomie du pancréas sans tenir compte de l'état anormalement épais du mucus [Farber S., 1945]. Ce dernier terme est très utilisé, en particulier dans les milieux non anglophones. Cependant ces deux dénominations ne reflètent pas l'étendue de la maladie, qui est en fait une pathologie polyviscérale.

Ce n'est qu'en 1946 qu'Anderson et Hodges mirent en évidence l'origine génétique de la mucoviscidose [Andersen D.H. & Hodges R.G., 1946].

L'anomalie de transport d'électrolytes fût découverte en 1953 par Di Sant'Agnese et collaborateurs [Di Sant'Agnese P.A. *et al.*, 1953], mais ce n'est qu'en 1983 que le défaut de transport d'ions chlorure fût identifié par Quinton [Quinton P.M., 1983].

2. DONNÉES PATHOLOGIQUES SUR LA MUCOVISCIDOSE

La mucoviscidose est une maladie polyviscérale touchant principalement les poumons, le pancréas, le foie, les intestins et le système reproducteur (**FIGURE I3**).

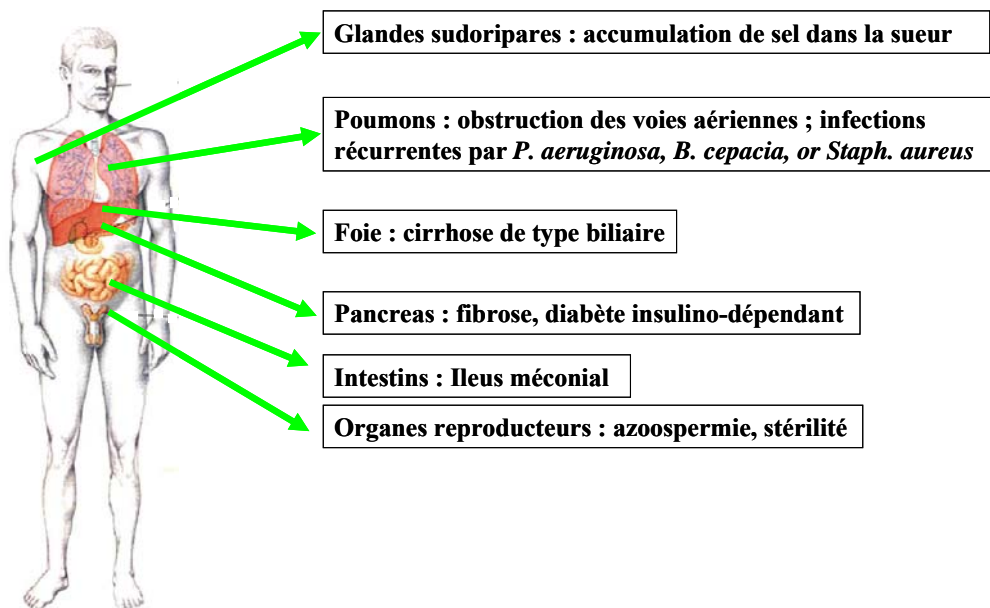


FIGURE I3 : Schéma représentant les principaux organes touchés par la mucoviscidose. Ne sont représentées ici que les principales manifestations de la maladie. Modifiée d'après Welsh M.J. & Smith A.E., 1995.

Chez les malades, la mortalité à un âge précoce est principalement due à la détérioration des fonctions pulmonaires suite à une inflammation chronique aggravée par des infections par une bactérie pathogène opportuniste telle que *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus* [Lyczak J.B. *et al.*, 2002]. Ce sont ces atteintes pulmonaires qui conditionnent le pronostic vital mais aussi la qualité de la survie des patients [Davis P.B. *et al.*, 1996].

Outre les atteintes pulmonaires, on observe aussi une insuffisance pancréatique chez environ 90% des malades. L'anomalie pancréatique est principalement due à une forte diminution des sécrétions enzymatiques à cause de l'obstruction des canaux excréteurs par le mucus épais. Les proenzymes digestives sont alors séquestrées au niveau du pancréas où elles sont prématurément activées et entraînent la fibrose et la destruction de cet organe. De plus, 10% des nouveaux-nés atteints de mucoviscidose possèdent aussi un iléus méconial (obstruction de l'intestin par un méconium anormalement épais et visqueux, résultant d'une sécrétion d'enzymes protéolytiques insuffisante du pancréas) et 98% des hommes CF sont stériles en raison d'une azoospermie.

Enfin, un tiers des patients CF adultes possède des défauts dans les fonctions hépatiques. L'atteinte est principalement due à l'obstruction des petites voies biliaires, ce qui perturbe les fonctions digestives et métaboliques du foie. Dans 10% des cas, ces atteintes hépatiques peuvent conduire à une cirrhose biliaire focale.

B. LE GÈNE RESPONSABLE DE LA MUCOVISCIDOSE

L'origine génétique et le mode de transmission de la mucoviscidose ont été décrits dès 1946 [Anderson D.H. & Hodges R.G., 1946]. Cependant, le gène responsable restait à identifier. En 1985, Tsui et collaborateurs, par la technique de marqueurs RFLP (*Restriction Fragment Linked Polymorphism*), localisent ce gène sur le bras long du chromosome 7 [Tsui L.C. *et al.*, 1985; Knowlton R.G. *et al.*, 1985]. L'identification précise a été déterminée par clonage positionnel en 1989 [Riordan J.R. *et al.*, 1989]. Le gène *CFTR* est localisé sur le chromosome 7, au niveau du locus q31. C'est un gène s'étendant sur 250 kB comprenant 27 exons et codant un ARN messager de 6,5 kB (FIGURE I4) [Rommens J.M. *et al.*, 1989].

L'analyse de ce gène a montré son appartenance à la superfamille des transporteurs ABC [Riordan J.R. *et al.*, 1989]. Cette analyse a aussi montré sa conservation dans de nombreuses espèces et donc son importance du point de vue de l'évolution. Ce gène code pour une glycoprotéine de 1480 acides aminés appelée **CFTR** pour **C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane conductance **R**egulator. Il s'agit d'un canal chlorure exprimé au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales [Anderson M.P. *et al.*, 1991b].

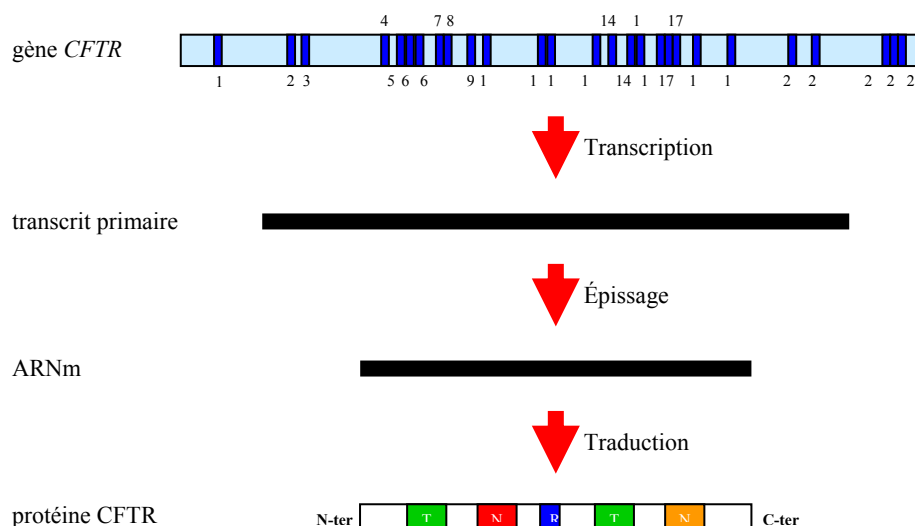


FIGURE I4 : Schéma représentant l'organisation du gène *CFTR* et le processus d'obtention de la protéine CFTR.

C. LES DIFFÉRENTES CLASSES DE MUTATIONS

Lorsqu'il est muté, le gène *CFTR* est responsable de la mucoviscidose. A ce jour, plus de 1500 mutations ont été identifiées, réparties sur tout le gène, et répertoriées par le «Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium» [<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>]. Parmi ces 1500 mutations, on retrouve :

- 42% de mutations faux-sens
- 15,5% d'insertions ou délétions décalant le cadre de lecture
- 14,5% de variations de séquence
- 12,5% de mutations entraînant un défaut d'épissage
- 10% de mutations non-sens
- 3% de larges insertions/délétions
- 2% d'insertions/délétions courtes respectant le cadre de lecture
- 0,5% de mutations dans le promoteur du gène.

Certaines de ces mutations sont associées à un phénotype particulier, mais ce n'est pas toujours le cas. La plupart des phénotypes observés sont le fait de la combinaison de mutations portées par les deux allèles, et sont souvent fortement dépendants de l'environnement du malade. En effet, un même couple de mutations peut parfois conduire à un phénotype différent [Clain J. *et al.*, 2005]. Ces mutations ont été réparties en six classes, de I à VI, en fonction de la modification apportée à la protéine CFTR et/ou à sa fonction (**FIGURE 15**) [Welsh M.J. & Smith A.E., 1993 ; Haardt M. *et al.*, 1999].

Introduction

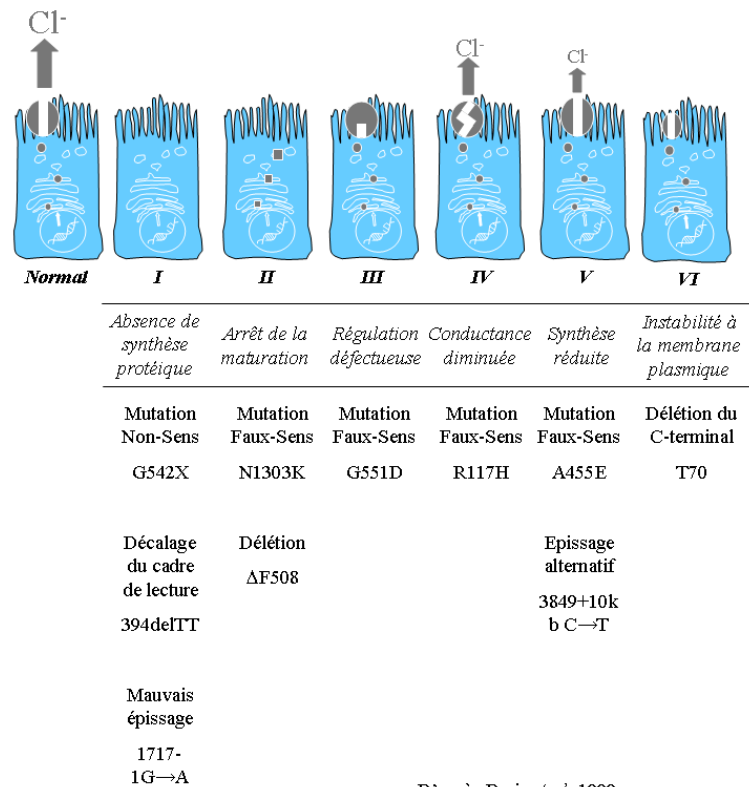


FIGURE 15: Classification des mutations identifiées au niveau du gène *CFTR* en fonction des altérations moléculaires de protéine CFTR.

La **classe I** correspond à des mutations altérant la biosynthèse de la protéine CFTR. Il en résulte une absence totale ou partielle de la protéine. Cette classe comprend des mutations non-sens, c'est-à-dire l'apparition d'un codon stop prématuré à la place d'un acide aminé (ex.: G542X), des mutations décalant le cadre de lecture (ex. : 394delTT), et des mutations entraînant un mauvais épissage de l'ARNm (ex. : 1717-1G→A). Dans certains cas, l'ARNm produit est instable et la protéine n'est pas synthétisée. Dans d'autres cas, la protéine est produite mais est très instable et rapidement dégradée.

La **classe II** correspond à des mutations entraînant un défaut de maturation de la protéine CFTR. De nombreuses mutations appartiennent à cette classe et entraînent la synthèse en quantité réduite, voire l'absence totale, de protéines à la membrane apicale des cellules épithéliales. Les anomalies géniques observées sont des mutations faux-sens (remplacement d'un acide aminé par un autre, ex. : N1303K) ou des délétions d'acides aminés. La mutation la plus représentative de cette classe est la délétion d'une phénylalanine en position 508 de CFTR (F508del), qui représente plus de 70% des mutations identifiées sur le gène *CFTR* [Kerem B.-S. *et al.*, 1989].

Les mutations appartenant à la **classe III** sont responsables d'un défaut de régulation du canal CFTR. Ces mutations sont la plupart du temps situées dans les domaines de liaison aux nucléotides. Les protéines mutées sont capables d'atteindre la membrane plasmique mais ne conservent que très peu d'activité. Les anomalies géniques observées correspondent à des mutations faux-sens (ex. : G551D).

La **classe IV** comprend des mutations entraînant un défaut dans la conductance des ions chlorure par la protéine CFTR. La plupart de ces mutations sont situées dans les segments transmembranaires impliqués dans la formation du pore ionique. Les anomalies génétiques observées sont des mutations faux-sens, comme la mutation R117H, située à l'extrémité du premier segment transmembranaire.

La **classe V** regroupe des mutations altérant la stabilité de l'ARNm. Ces mutations sont situées soit dans le promoteur, soit dans les sites d'épissage du gène *CFTR* (ex.: 3849+10kbC→T), soit sur sa partie codante avec des mutations faux-sens (ex. : A455E). Elles conduisent à une synthèse protéique réduite.

Enfin la **classe VI**, la dernière décrite, contient des mutations situées au niveau de la partie C-terminale et qui altèrent la stabilité de CFTR à la membrane plasmique. La protéine fonctionnelle est alors capable d'atteindre la membrane plasmique, mais elle est très rapidement internalisée et dégradée par les voies ubiquitine/protéasome et du lysosome [Haardt M. *et al.*, 1999 ; Benharouga *et al.*, 2001 ; Sharma *et al.*, 2004].

D. INCIDENCE DES MUTATIONS SUR LA POPULATION

L'incidence de la mucoviscidose sur la population dépend fortement de l'origine géographique et ethnique du patient. Pour les populations d'origine caucasienne, l'incidence est d'une naissance sur 3 000, avec cependant des différences locales. Elle est par exemple d'une naissance sur 4200 en France, d'une sur 1 700 en Irlande ou d'une sur 377 dans le Finistère Nord (**FIGURE 16**). Les populations d'origine non-caucasienne, que l'on a longtemps cru épargnées par la maladie, ne sont en fait que beaucoup moins affectées. La fréquence est par exemple de seulement une naissance sur 15 000 dans la population afro-américaine [Hamosh A. *et al.*, 1998] ou une naissance sur 350 000 au Japon [Yamashiro Y. *et al.*, 1997]. Il est aussi important de préciser qu'en fonction de la localisation géographique, la mutation majoritairement identifiée n'est pas la même. La mutation F508del est en effet la plus représentée en Europe, en Amérique du Nord et en Australie (**FIGURE 16**).

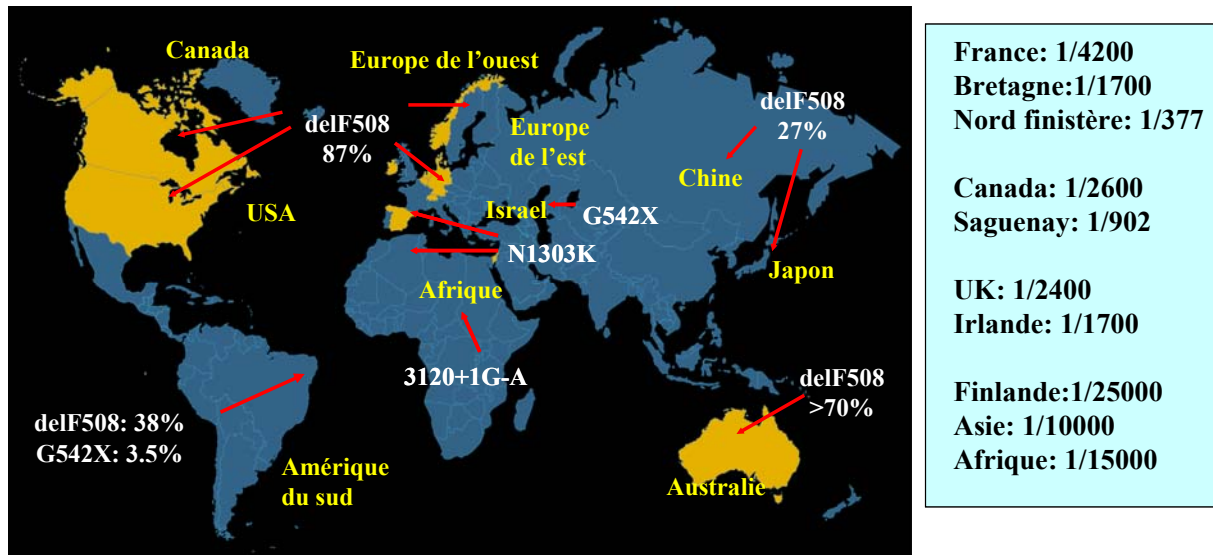


FIGURE I6: Répartition géographique de la population mucoviscidose. L'incidence moyenne dans la population mondiale est d'une naissance sur 2500 avec cependant des variations géographiques et ethniques. Les régions les plus touchées sont représentées en jaune. D'après F. Becq.

E. L'AVANTAGE SÉLECTIF

Il est étonnant que des mutations telles que F508del ou G542X, altérant le trafic et la fonction d'une protéine aussi importante que CFTR, soient aussi représentées dans la population. L'hypothèse la plus plausible est que l'hétérozygotie au niveau du gène *CFTR* apporte un avantage sélectif à son porteur. La résistance à de nombreuses maladies ou épidémies apportée par l'hétérozygotie au niveau de *CFTR* est suspectée depuis très longtemps [Anderson C.M. *et al.*, 1967]. Les affections les plus connues pour lesquelles la présence d'un allèle *CFTR* muté pourrait apporter une résistance sont le choléra, la fièvre typhoïde et la tuberculose. Ainsi, la diminution du nombre de canaux à la membrane ou le dysfonctionnement de ceux-ci verrait la sécrétion de fluide diminuée lors d'une exposition à la toxine cholérique ou à l'entérotoxine d'*E. coli*. Les malades seraient alors moins sujets aux épisodes diarrhéiques à l'origine du pronostic morbide de ces infections [Rodman D.M. & Zamudio S., 1991 ; Gabriel S.E. *et al.*, 1994 ; Goldstein J.L. *et al.*, 1994]. Cependant, il existe des controverses quant à ces observations, puisqu'il a été montré qu'il n'existe pas de différences de sécrétions d'ions chlorure entre les hétérozygotes et les homozygotes sains [Hogenauer C. *et al.*, 2000].

Par ailleurs, la survenue de la fièvre typhoïde nécessite la présence de CFTR à la membrane plasmique. Ainsi, l'attachement de la bactérie responsable, *Salmonella typhi*, à la muqueuse intestinale serait diminué chez les porteurs sains du fait de la diminution du nombre

de protéines à la membrane, ce qui réduirait leur susceptibilité à la fièvre typhoïde [Pier G.B. *et al.*, 1998 ; Van de Vosse E. *et al.*, 2005].

L'avantage sélectif dû à l'hétérozygotie implique aussi la résistance à d'autres maladies, comme la grippe [Shier W.T., 1979] ou l'asthme [Schroeder S.A. *et al.*, 1995]. Cependant, ces hypothèses restent très controversées [Mennie M. *et al.*, 1995].

IX. LA PROTÉINE CFTR

A. BIOSYNTÈSE, ADRESSAGE ET DÉGRADATION DE CFTR

1. BIOSYNTÈSE ET MATURATION DE CFTR

i. GÉNÉRALITÉS SUR LES PROTÉINES MEMBRANAIRES

Les protéines membranaires sont toutes synthétisées au niveau du RE, un compartiment qui joue un rôle essentiel dans le repliement et la maturation de celles-ci. Le repliement des protéines dans le RE se fait par l'action combinée de nombreuses chaperonnes servant de senseurs de repliement [Gething M.J. & Sambrook J., 1992]. Ces dernières s'associent pour la plupart à la chaîne polypeptidique naissante et l'aident au repliement tant qu'elle n'a pas acquis son état natif. Afin d'assurer un processus de maturation correct, la sortie du RE est régulée par le système de contrôle qualité du RE appelé ERQC (*Endoplasmic Reticulum Quality Control*), qui empêche le trafic des protéines mal repliées et les dirige vers la dégradation [Ellgaard L. & Helenius A., 2001].

ii. MATURATION DE CFTR

Comme toutes les protéines membranaires, CFTR est synthétisée dans le RE, sous la forme d'un précurseur qui va ensuite subir un processus de maturation complexe comprenant différentes étapes de glycosylation. La séquence de CFTR contient deux sites potentiels de N-glycosylation : deux asparagines en position 894 et 900 sont présentes au niveau de la 4^{ème} boucle extracellulaire, sur lesquelles une chaîne oligosaccharidique peut se former. Il est donc possible, après migration sur gel SDS-polyacrylamide et western blot, de visualiser les différents «niveaux» de maturation de la protéine [Cheng S.H. *et al.*, 1990 ; Gregory R.J. *et al.*, 1990]. Celle-ci est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur non-glycosylé de poids moléculaire avoisinant 130 kDa et appelé forme A. Ce précurseur est ensuite rapidement glycosylé au niveau du RE pour donner une forme immature de 140 kDa appelée core-glycosylée ou forme B, riche en mannoses et sensible à l'Endoglycosidase H (Endo H)

[Lukacs G.L. *et al.*, 1994 ; Ward C.L. & Kopito R.R., 1994]. La forme mature ou complexe-glycosylée est obtenue au niveau de l'appareil de Golgi, où les mannoses sont remplacés par des glucides complexes. Cette forme de 170 kDa, appelée forme C, est insensible à l'endoH mais est sensible à la Peptide N-Glycanase F (PNGase F).

La maturation de la protéine CFTR est un processus très inefficace (**FIGURE 17**). En effet, environ 70% de la forme B sont séquestrés au niveau du RE et sont rapidement dégradés (la demi-vie est proche de 30 min). 30% de la forme B sont capables de quitter le RE pour l'appareil de Golgi et ainsi atteindre le niveau final de maturation (la forme C). Le faible taux de maturation de CFTR semble être dû à un processus de repliement complexe impliquant de nombreuses interactions intra- et intermoléculaires. La forme immature de CFTR semble posséder une conformation altérée par rapport à la forme mature [Chen E.Y.-J. *et al.*, 2000].

En outre, cette inefficacité de maturation ne semble pas être due à la surexpression de la protéine dans les cellules, mais semble être très dépendante de la lignée cellulaire dans laquelle est exprimée CFTR. En effet, Varga et collaborateurs ont montré que l'efficacité du processus de maturation de CFTR peut atteindre les 100% dans des cellules épithéliales Calu-3 et T84 exprimant CFTR de manière constitutive [Varga K. *et al.*, 2004].

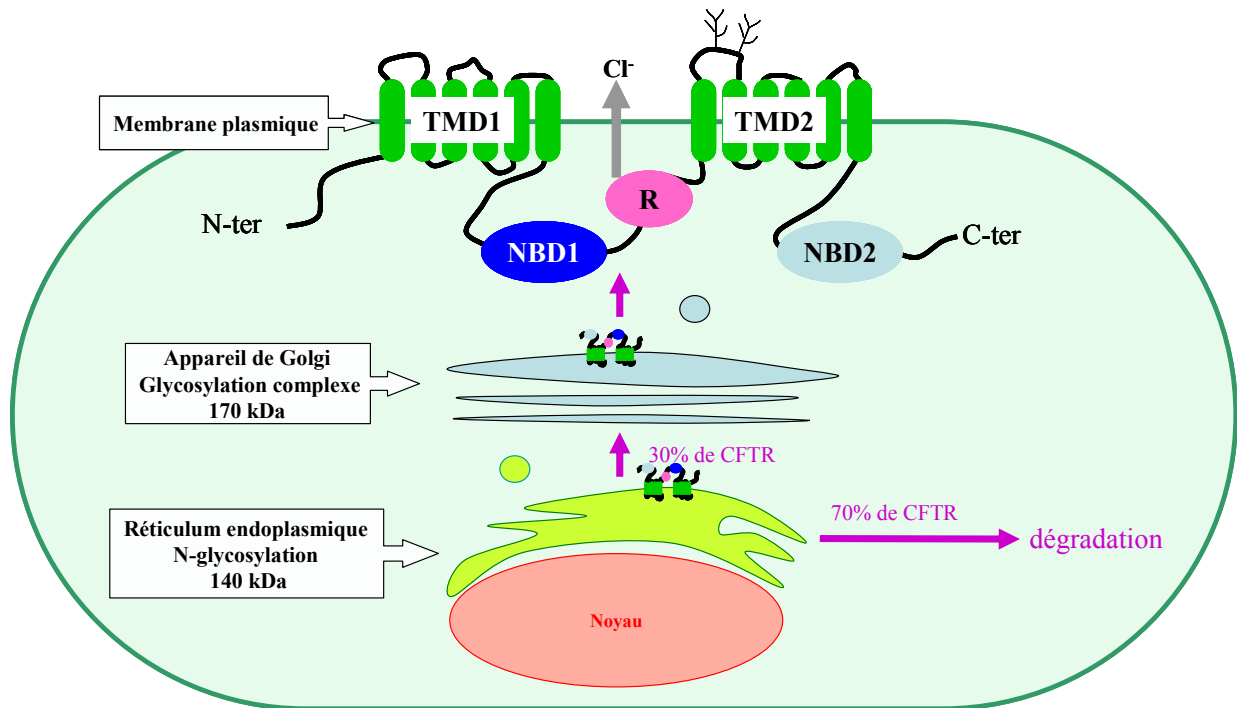


FIGURE 17: Illustration du processus de biosynthèse et de maturation de la protéine CFTR.

2. TRANSPORT INTRACELLULAIRE DE CFTR

i. LE TRANSPORT RE-APPAREIL DE GOLGI

Seulement 30% de la protéine CFTR néosynthétisée arrivent à passer la barrière de l'ERQC. Ceux-ci sont alors transportés vers la membrane plasmique pour assurer la fonction de transport des ions chlorure. Les voies empruntées par CFTR pour atteindre la membrane plasmique restent encore très mal connues, malgré leur présence dans de nombreux compartiments tels que le RE, l'appareil de Golgi, les endosomes ou les lysosomes [Bertrand C.A. & Frizzell R.A., 2003]. L'export de CFTR hors du RE se fait par l'intermédiaire de vésicules COPII (*COat Protein II*) bourgeonnant à partir du RE [Schekman R. & Orci L., 1996 ; Wang X. *et al.*, 2004]. Ces vésicules COPII fusionnent par la suite avec un complexe tubulo-vésiculaire appelé ERGIC (*ER/Golgi Intermediate Compartment*) ou VTC (*Vesicular Tubular Cluster*), situé du côté *cis* de l'appareil de Golgi [Aridor M. *et al.*, 1995]. Ce complexe est caractérisé par la présence d'une protéine transmembranaire non glycosylée de 53kDa : ERGIC53 (p53/p58), protéine de liaison aux vésicules impliquées dans le transport RE-appareil de Golgi de la majorité des protéines transmembranaires, de p63 et de la syntaxine 5 [Schweizer A. *et al.*, 1993 ; Pelham H.R.B., 1997]. Cependant, aucune interaction entre la protéine CFTR sauvage et ERGIC53 n'a été décrite, bien qu'une colocalisation ait pu être observée entre celle-ci et la protéine CFTR-F508del [Gilbert A. *et al.*, 1998].

Pour que la protéine CFTR puisse quitter le RE, il faut qu'une séquence signal d'export composée principalement de deux acides aspartiques situés en position 565 et 567 (YKDAD) et exposés à la surface de NBD1, soit reconnue par des membres du complexe COPII [Lewis H.A. *et al.*, 2004 ; Wang X. *et al.*, 2004]. Il a aussi été montré que la mutation de YKDAD en YKAAA entraînait la rétention de CFTR dans le RE [Wang X. *et al.*, 2004]. Il existe cependant au niveau de CFTR des séquences de type RXR impliquées dans la rétention dans le RE des protéines mal repliées : ²⁹RQR³¹, ⁵¹⁶RYR⁵¹⁸, ⁵⁵³RAR⁵⁵⁵ et ⁷⁶⁴RRR⁷⁶⁶ [Riordan J.R. *et al.*, 1989]. Ces motifs semblent empêcher le transport RE-appareil de Golgi d'avoir lieu, et la mutation de ceux-ci, en particulier ²⁹RQR³¹ et ⁵⁵³RAR⁵⁵⁵, permet de le restaurer [Chang X.-B. *et al.*, 1999 ; Hegedüs T. *et al.*, 2006]. Il est probable que dans une protéine CFTR sauvage, ces sites soient masqués, alors qu'ils sont accessibles dans la protéine CFTR-F508del du fait de son repliement altéré.

Un transport rétrograde de CFTR de l'appareil de Golgi vers le RE *via* des vésicules de type COPI a aussi été mis en évidence [Bannykh S.I. *et al.*, 2000 ; Hegedüs T. *et al.*, 2006].

Il existe en fait deux voies d'adressage décrites pour l'export de la protéine CFTR du RE [Yoo J.-S. *et al.*, 2002]. La première est la voie classique d'acheminement de CFTR à travers

l'appareil de Golgi, qui consiste en un transfert progressif du compartiment *cis*- vers le compartiment *trans*-Golgi et au cours duquel la glycosylation complexe a lieu [Wang X. *et al.*, 2004]. La seconde voie, dite non conventionnelle, implique quant à elle un transport vésiculaire direct entre le RE et le compartiment *trans*-Golgien [Yoo J.-S. *et al.*, 2002]. Cette seconde voie semble être en accord avec la faible accumulation de CFTR dans l'appareil de Golgi décrite par Bannykh et ses collaborateurs [Bannykh S.I. *et al.*, 2000].

ii. LE TRANSPORT GOLGI-MEMBRANE PLASMIQUE

Le transport de CFTR de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique reste encore très mal connu. Il est cependant établi qu'il nécessite des interactions protéine-protéine, en particulier *via* la séquence DTRL portée par la partie C-terminale de CFTR et des protéines à domaines PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) [Cheng J. *et al.*, 2002]. La compétition entre les protéines à domaines PDZ NHE-RF1 (*Na⁺-H⁺ Exchange-Regulatory Factor*) et CAL (*CFTR Associated Ligand*) semble être très importante. L'interaction entre NHE-RF1 et CFTR favorise l'adressage à la membrane plasmique et l'interaction entre CAL et CFTR favorise quant à elle la séquestration de la protéine à l'intérieur de la cellule [Cheng J. *et al.*, 2002 & 2004]. Cependant, des études contradictoires montrent que l'absence de la séquence DTRL au niveau de la partie C-terminale de CFTR induit une dissociation des protéines NHE-RF1 et CFTR sans incidences significatives sur la localisation apicale du canal [Benharouga M. *et al.*, 2003 ; Ostedgaard L.S. *et al.*, 2003]. Ces résultats suggèrent donc qu'en plus de la séquence DTRL, d'autres signaux impliqués dans l'adressage de CFTR de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique doivent exister.

3. DÉGRADATION DE CFTR

iii. AU NIVEAU DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE

Seulement 30% de CFTR nouvellement synthétisés sont capables de quitter le RE pour la membrane plasmique. Les 70% restants sont séquestrés et dégradés au niveau du RE, principalement par le système ubiquitine/protéasome [Ward C.L. & Kopito R.R., 1994 ; Lukacs G.L. *et al.*, 1994 ; Gelman M. *et al.*, 2002]. Les protéines sont d'abord contrôlées par le système ERQC qui est composé de plusieurs protéines chaperonnes, dont les principales sont la calnexine et la calréticuline. Ces chaperonnes interagissent avec les protéines durant leur repliement co- et post-traductionnel pour éviter que des formes mal repliées ne quittent le RE [Pind S. *et al.*, 1994 ; Loo M.A. *et al.*, 1998 ; Ahner R.A. & Brodsky J.L., 2004].

Introduction

Les protéines reconnues comme mal repliées sont par la suite dirigées vers un autre système, appelé ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*), dont la principale fonction est la dégradation. Ce système est lui aussi composé de plusieurs protéines chaperonnes dont Hsp70 et 90, Hsc70 et la calnexine et implique la rétrotranslocation de la protéine incriminée vers le cytoplasme *via* le canal Sec61 avant sa dégradation par le protéasome [Nakatsukasa K. & Brodsky J.L., 2008]. En ce qui concerne la dégradation de la protéine CFTR, la principale chaperonne intervenant est la calnexine, qui va retenir la glycoprotéine dans le RE par une interaction prolongée permettant le retrait d'un mannose de la forme immature par l'intermédiaire d'une mannosidase I [Pind S. et al., 1994 ; Ward C.L. & Kopito R.R., 1994]. La perte de ce mannose va constituer un signal de dégradation [Jakob C.A. et al., 2001] et la protéine ainsi déglycosylée va être reconnue par une lectine résidente du RE, l'EDEM (*ER Degradation-Enhancing 1,2-Mannosidase-like protein*), celle-ci constituant une interface entre la calnexine et l'ERAD. La suite de la séquence est la translocation de la protéine déglycosylée par le canal Sec61 et sa dégradation par le protéasome [Bebök Z. et al., 1998]. D'autres chaperonnes sont aussi impliquées dans l'ERAD, en particulier Hsp70 et 90. Ces deux chaperonnes facilitent la formation d'un complexe comprenant en particulier CHIP, une E3 ubiquitine ligase, protéine centrale reliant les Hsp à la dégradation [Meacham G.C. et al., 2001 ; Younger J.M. et al., 2004]. Il s'ensuit alors la polyubiquitinylation de la protéine complexée à Hsp70 puis sa dégradation par le protéasome [Jensen T.J. et al., 1995 ; Ward C.L. et al., 1995 ; Gelman M. et al., 2002].

Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome, la lactacystine et le MG-132, n'entraîne pas l'inhibition totale de la dégradation de CFTR [Jensen T.J. et al., 1995 ; Ward C.L. et al., 1995] suggérant l'implication d'autres voies de dégradation dans l'élimination de CFTR. Des équipes ont ainsi montré que des cystéines protéases pouvaient être impliquées [Stratford F.L. et al., 2003]. De même, il a été démontré que la déplétion en ATP, nucléotide pourtant nécessaire au fonctionnement du système ubiquitine/protéasome, n'a pas d'effets significatifs sur la dégradation de CFTR, suggérant la présence d'une autre voie de dégradation qui serait ATP-indépendante [Lukacs G.L. et al., 1994]. Récemment, un système de dégradation de CFTR ATP-indépendant mais GTP-dépendant a été mis en évidence au niveau du RE [De Keukeleire B. et al., 2008].

iv. ENDOCYTOSE ET RECYCLAGE DE CFTR

Après un processus de maturation et d'adressage, la protéine CFTR va atteindre la membrane plasmique où elle va être rapidement internalisée (**FIGURE 18**) [Prince L.S. et al.,

1994]. Cette internalisation semble être assurée par des vésicules à manteau de clathrine qui vont adresser les protéines vers les endosomes [Lukacs G.L. *et al.*, 1997]. Il a aussi été démontré que des motifs di-leucine et tyrosine présents au niveau des domaines N- et C-terminaux constituent un signal d'endocytose, la tyrosine située en position 1424 jouant un rôle central [Prince L.S. *et al.*, 1999 ; Hu W. *et al.*, 2001]. L'internalisation de CFTR se fait par l'interaction de protéines adaptatrices spécifiques de la membrane plasmique telles que les complexes AP-1 et AP-2 (AP pour *Adaptor Protein*), et les séquences spécifiques portées par les extrémités de CFTR [Bradbury N.A. *et al.*, 1994].

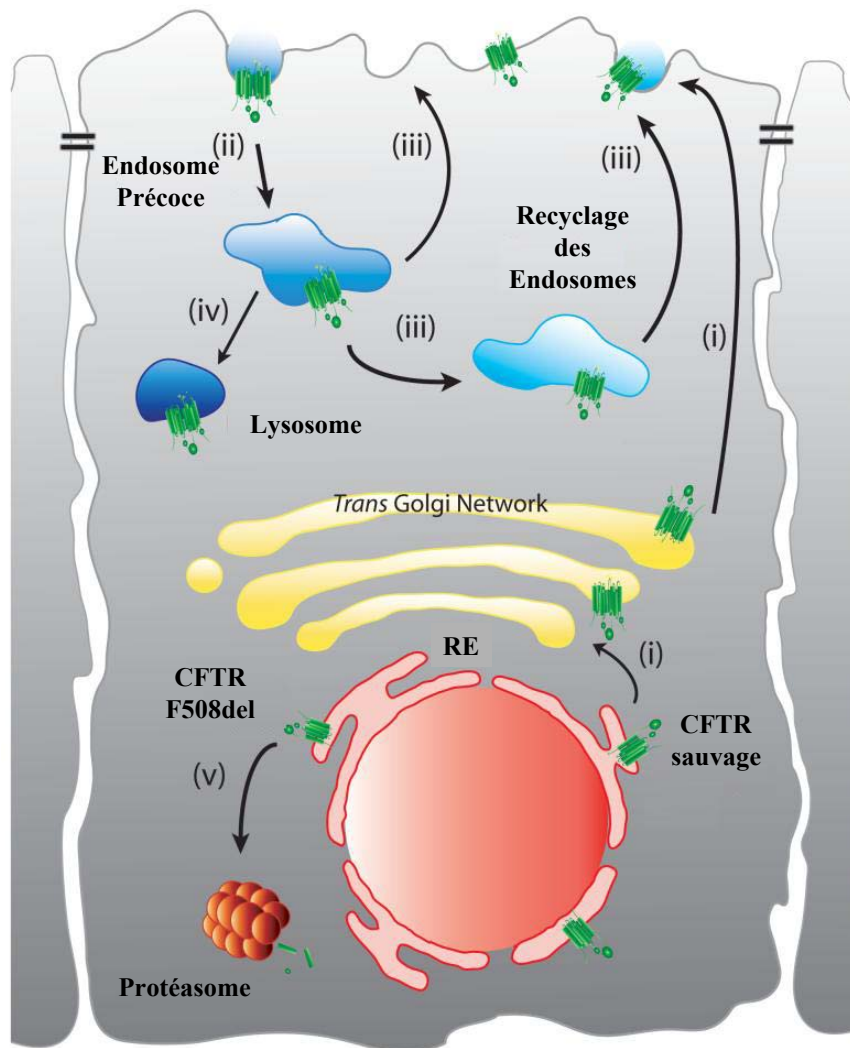


FIGURE 18 : Modèle représentant le trafic intracellulaire de CFTR. i: transport de CFTR du RE vers l'appareil de Golgi puis vers la membrane plasmique ou vers la dégradation par le protéasome (v); ii: CFTR est internalisée dans des vésicules à manteau de clathrine puis soit est recyclé à la membrane de manière endosome-dépendante ou non (iii), soit est dégradée par l'intermédiaire du lysosome (iv). D'après Ameen N. *et al.*, 2007.

Théoriquement, AP-1 intervient dans le transport des protéines du TGN (*TransGolgi Network*) vers d'autres compartiments et AP-2 intervient au niveau de la membrane

plasmique. Après bourgeonnement d'une vésicule depuis la membrane plasmique et perte de son manteau de clathrine, AP-2 et la clathrine sont recyclées à la membrane plasmique comme des protéines solubles. Des expériences de pull-down ont montré que CFTR se liait par sa partie C-terminale à la protéine AP-2 mais pas à la protéine AP-1 [Weixel K.M. & Bradbury N.A., 2000]. Les auteurs montrent que la tyrosine (Y) 1424 joue un rôle central. En effet la mutation Y1424A diminue la vitesse d'internalisation de CFTR et augmente légèrement le nombre de canaux à la membrane [Weixel K.M. & Bradbury N.A., 2000 & 2001]. De même, l'internalisation est très perturbée si les sites d'interactions CFTR/myosine VI sont masqués [Swiatecka-Urban A. *et al.*, 2004].

Les protéines internalisées sont alors soit recyclées à la membrane plasmique, soit adressées à la voie de dégradation lysosomale. Les protéines recyclées sont transportées vers le compartiment des endosomes de recyclage (ERC, *Endosomal Recycling Compartment*) [Mukherjee S. *et al.*, 1997]. Picciano et collaborateurs ont montré que CFTR entre dans ce compartiment et est recyclée à la membrane plasmique [Picciano J.A. *et al.*, 2003]. Ce phénomène de recyclage est absolument nécessaire afin de pallier à l'internalisation constitutive de CFTR et par conséquent augmenter sa demi vie à la membrane ($T_{1/2} = 14$ à 18h) [Swiatecka-Urban A. *et al.*, 2002 ; Sharma M. *et al.*, 2004]. Gentzsch et collaborateurs ont quant à eux montré que la surexpression de Rme-1 et Rab11, GTPases effectrices des endosomes de recyclage, induisait l'accumulation de CFTR dans les endosomes, suggérant leur rôle dans la régulation de la sortie de CFTR des ERC [Gentzsch M. *et al.*, 2004].

4. RÔLE DES PROTÉINES CHAPERONNES

De nombreuses protéines chaperonnes sont impliquées dans les processus de synthèse, de maturation et de dégradation de la protéine CFTR. En effet, il est maintenant reconnu qu'au cours de son processus de repliement, CFTR se lie à différentes chaperonnes moléculaires cytosoliques et résidentes du RE ainsi qu'à des enzymes, en particulier de modification des parties glycosidiques, appartenant au système ERAD [Pind S. *et al.*, 1994 ; Loo M.A. *et al.*, 1998 ; Brodsky J.L., 2001 ; Ahner A. & Brodsky J.L., 2004 ; Wang X. *et al.*, 2006]. Le mécanisme de discrimination des protéines correctement et incorrectement repliées, ERQC, implique de nombreuses chaperonnes, ainsi que des co-chaperonnes, afin d'une part d'éviter l'agrégation et d'autre part de conduire les protéines mal repliées vers la dégradation [Meacham G.C. *et al.*, 2001]. Parmi ces protéines chaperonnes qui interagissent avec CFTR on trouve Hsp70, Hsp90 et la calnexine (**FIGURE 19**).

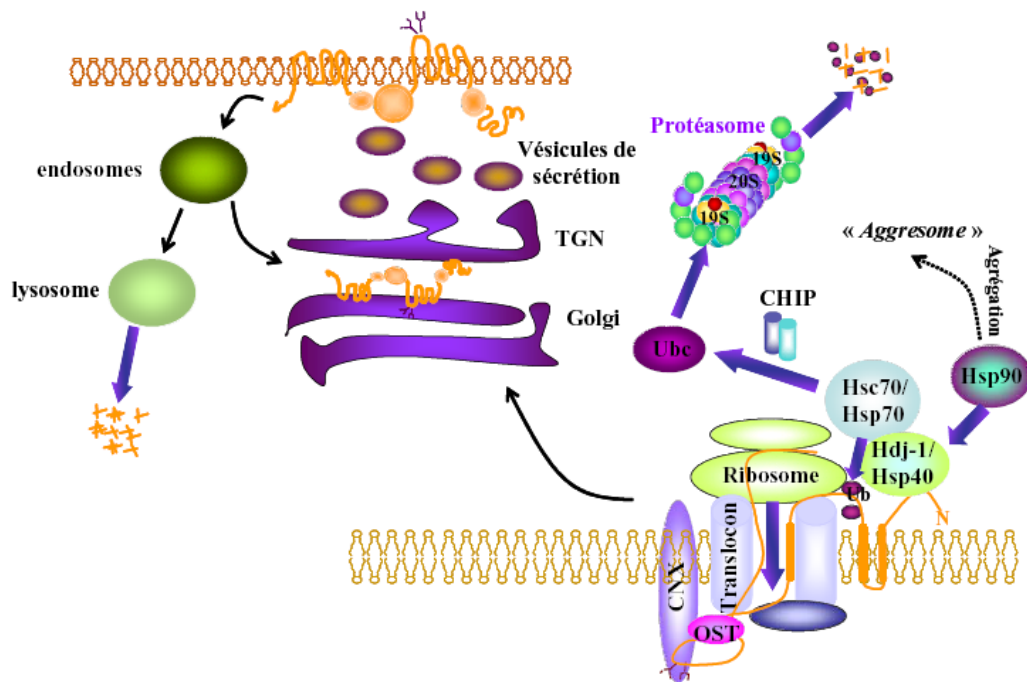


FIGURE 19: Principales protéines chaperonnes impliquées dans l'ERQC. Modifié d'après Farinha C.M. et *al.*, 2002.

i. HEAT SHOCK PROTEIN 70 (Hsp70)

La famille des protéines Hsp70 est constituée de protéines d'environ 70 kDa inductibles par un choc thermique comprenant notamment la co-chaperonne BiP (*B*inding *I*g *P*rotein ou GRP78 pour *G*lucose *R*egulated *P*rotein). Hsp70, impliquée dans le repliement des protéines, a été parmi les premières chaperonnes à avoir été décrite comme interagissant avec la protéine CFTR nouvellement synthétisée [Yang Y. et *al.*, 1993]. Cette protéine forme avec Hsp40 et différentes co-chaperonnes (Hdj1/2, CHIP, HspB1,...) un complexe multiprotéique influençant l'adressage des protéines vers leur voie de sécrétion ou de dégradation. Pour une protéine CFTR correctement repliée, cette interaction est transitoire et est rompue lorsque CFTR quitte le RE pour aller vers l'appareil de Golgi. Au contraire, lorsque CFTR est mal repliée, cette interaction est beaucoup plus longue et CFTR reste associée à Hsp70 jusqu'à sa dégradation.

Hsc70 (*H*eat *s*hock *c*ognate 70), forme constitutive de Hsp70, et sa co-chaperonne Hdj-2, ont été décrites comme interagissant transitoirement avec NBD1, cette interaction étant rompue lors de la synthèse du domaine R [Strickland E. et *al.*, 1997 ; Meacham G.C. et *al.*, 1999]. Cette association faciliterait les premières étapes d'assemblage de CFTR dans le RE. La co-chaperonne CHIP (*C*-terminus of *H*sc70 *I*nteracting *P*rotein) est colocalisée avec Hsc70 et CFTR dans le RE, et la surexpression de CHIP retiendrait CFTR dans le RE et faciliterait son ubiquitinylation et sa dégradation [Meacham G.C. et *al.*, 2001]. Il existe enfin

une troisième co-chaperonne interagissant avec Hsc70 impliquée dans le processus de maturation de CFTR: Csp (*Cystein string protein*). Celle-ci, en se liant à sa partie N-terminale, régule le transport et la maturation de CFTR [Zhang H. *et al.*, 2002].

ii. HEAT SHOCK PROTEIN 90 (Hsp90)

La famille des protéines Hsp90, comprenant par exemple la protéine GRP94, est constituée de protéines d'environ 90 kDa inductibles par un choc thermique. Ce sont des agents stabilisateurs de conformation, prévenant l'agrégation des protéines mal repliées [Schneider C. *et al.*, 1996]. Hsp90 semble être impliquée dans la stabilisation de la protéine CFTR néosynthétisée car son inhibition entraîne un blocage de la biosynthèse et une accélération de la dégradation de celle-ci [Loo M.A. *et al.*, 1998]. De même, l'inactivation des homologues d'Hsp90 dans la levure, Hsp82 et Hsc82, perturbe la stabilité de CFTR, démontrant le rôle de la chaperonne Hsp90 dans le repliement post-traductionnel de la protéine [Youker R.T. *et al.*, 2004]. Dans la cellule, il semblerait que la protéine CFTR non encore repliée soit prise en charge par le complexe chaperonne-co-chaperonne Hsc70, puis transférée vers le complexe Hsp90 lorsqu'elle acquiert une conformation correcte, celle-ci empêchant l'agrégation de NBD1 [Wegele H. *et al.*, 2006]. Récemment, de nouvelles co-chaperonnes de Hsp90 ont été découvertes, Aha1 et p23, plaçant Hsp90 au centre d'un processus de décision concernant le devenir de CFTR (**FIGURE 19**) [Wang X. *et al.*, 2006].

iii. LA CALNEXINE

Pour les glycoprotéines, l'ERQC implique deux lectines homologues résidentes du RE. Une protéine transmembranaire, la calnexine, qui est une lectine réticulaire de 90 kDa [Wada I. *et al.*, 1991], et une protéine soluble, la calréticuline. Ces deux protéines reconnaissent le motif glycosidique Glc₁Man₉GlcNac₂, résultant de l'action combinée des glucosidases I et II présentes dans le RE [Hammond C. *et al.*, 1994 ; Hebert D.N. *et al.*, 1995 ; Ware F.E. *et al.*, 1995]. Si la glycoprotéine atteint sa conformation native, elle n'est pas retenue dans le RE et elle est transportée vers l'appareil de Golgi pour achever sa maturation. Si ce n'est pas le cas, un résidu glucose est ajouté sur le N-glycane par l'action de l'UDPglucose glucosyltransférase (UGGT) [Parodi A.J., 2000], ce qui facilite, à nouveau, la liaison de la calnexine et l'entrée de la glycoprotéine dans une voie de repliement appelée le cycle de la calnexine [Wada I. *et al.*, 1997]. Ce cycle se poursuit jusqu'à ce que la glycoprotéine acquiert sa structure native et soit exportée vers l'appareil de Golgi ou bien dirigée vers la dégradation.

L'interaction entre la calnexine et les protéines néosynthétisées se fait très tôt dans le processus de maturation co-traductionnelle [Chen W. *et al.*, 1995]. La séparation de la protéine par la calnexine correspondrait alors au signal d'export de la glycoprotéine du RE vers l'appareil de Golgi [Ou W.J. *et al.*, 1993 ; Hammond C. *et al.*, 1994].

Le mode d'interaction de la calnexine avec une protéine CFTR sauvage de conformation intermédiaire, reste encore mal défini. Des études ont montré que la calnexine était transitoirement associée à la forme immature de CFTR sauvage, alors qu'elle restait plus longtemps associée à CFTR-F508del, jusqu'à la dégradation par le système ERAD [Pind S. *et al.*, 1994 ; Ward C.L. & Kopito R.R., 1994]. Cependant, il a été dernièrement démontré que la surexpression de la calnexine entraînerait aussi le blocage de CFTR sauvage dans le RE, en la protégeant de la dégradation. Il existerait donc deux points de contrôle au niveau du RE, dont l'un, indépendant de la calnexine, prendrait en charge CFTR-F508del pour l'amener vers la dégradation [Farinha C.M & Amaral M.D., 2005].

B. LES FONCTIONS DE CFTR

1. CFTR EST UN CANAL CHLORURE

i. LE TRANSPORT EPITHELIAL DES IONS Cl^-

Le tissu épithélial forme une barrière continue entre les compartiments intra- et extracellulaire. Ce tissu est composé de cellules épithéliales polarisées jointes, possédant un domaine apical dirigé vers la lumière de tube et un domaine basolatéral reposant sur la lame basale. Du fait de la présence abondante de jonctions serrées, les échanges trans-épithéliaux ne peuvent s'effectuer qu'à travers des canaux ioniques, des transporteurs et des échangeurs situés dans les membranes basolatérales et apicales.

Les épithélia peuvent être classés selon la direction du flux ionique qui les traverse. Dans un épithélium sécréteur, l'absorption de Na^+ et la sécrétion de Cl^- sont les éléments majeurs de la fonction épithéliale. Dans ce type d'épithélium, le flux se fait du pôle basolatéral vers la lumière. La pompe Na^+/K^+ -ATPase produit la force motrice nécessaire au transport secondaire actif d'ions Cl^- . Les ions Cl^- entrent dans la cellule à travers la membrane basolatérale, par des co-transporteurs de type $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ et sortent du côté apical à travers les canaux chlorure (**FIGURE 110**).

Les canaux chlorure sont présents dans la membrane de toutes les cellules eucaryotes et jouent un rôle important dans l'excitabilité membranaire, la régulation du volume cellulaire, le transport transépithélial et la régulation du pH intracellulaire [Suzuki M. *et al.*, 2006]. Leur structure reste encore assez mal connue. L'importance des flux d'ions Cl^- dans la fonction

cellulaire a été pour la première fois mise en évidence grâce à l'étude des mécanismes de couplage stimulation-sécrétion des cellules exocrines [Seyama I., 1979 ; Petersen O.H. & Philpott H.G., 1980]. Cette importance des flux d'ions Cl^- est aussi appuyée par l'existence de nombreuses pathologies associées à des dysfonctionnements de canaux chlorure, comme la mucoviscidose [Quinton P.M., 1983] et la myotonie de Becker [Rüdel R. & Lehmann-Horn F., 1985].

Il existe trois grandes classes de canaux chlorure :

- Les récepteurs canaux, activés par des ligands et incluant les récepteurs GABA et glycine, clonés en 1987. Ces canaux s'assemblent en hétéropentamères, chaque monomère possédant quatre segments transmembranaires [Schofield P.R. *et al.*, 1987].
- Les canaux CLC (*Chloride Channel*), dont la structure de certains est connue [Dutzler R. *et al.*, 2002] connue, possèdent environ douze segments transmembranaires, fonctionnent sous forme multimérique et sont exprimés de manière ubiquitaire dans l'organisme [Dhani S.U. & Bear C.E., 2006].
- Le canal chlorure CFTR, localisé au niveau de la membrane apicale de plusieurs épithélia tels que l'intestin, les glandes salivaires, le pancréas et les voies respiratoires [Crawford L. *et al.*, 1991 ; Denning G.M. *et al.*, 1992b].

ii. CFTR EST UN CANAL CHLORURE

Depuis le début des années 80, il est connu que la membrane apicale des cellules épithéliales est le siège d'un transport d'ions Cl^- dépendant de l'AMPc et de la PKA (*Protéine Kinase A*) qui n'est pas détectable chez les malades atteints de mucoviscidose [Quinton P.M., 1983].

Malgré la découverte du gène responsable de la maladie en 1989 [Riordan J.R. *et al.*, 1989], le rôle de CFTR comme canal Cl^- sensible à l'AMPc n'a été mis en évidence que deux ans plus tard. En effet, ce n'est qu'en mutant les deux lysines (95 et 365), sensées influencer la séquence de perméabilité aux halogénures, que cette fonction a été mise en évidence [Anderson M.P. *et al.*, 1991b]. Elle a par la suite été confirmée après purification et reconstitution dans une membrane de cellules d'insectes [Bear C. *et al.*, 1992]. D'après la séquence protéique, il a été possible de définir une structure 3D du canal (**FIGURE III**), ce qui a permis d'envisager un rôle pour certains acides aminés dans le transport des ions Cl^- . La sélectivité ionique de CFTR est principalement due aux acides aminés chargés positivement présents dans les segments transmembranaires 1 et 6 [Akabas M.H. *et al.*, 1994 ; Cheung M.

& Akabas M.H., 1996 & 1997 ; Akabas M.H., 2000], mais la première boucle extracellulaire semble aussi être impliquée. CFTR est hautement spécifique aux anions, mais la sélectivité entre les halogénures est très faible et s'établit de cette manière : $\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$, indiquant de faibles interactions entre les anions et les sites de fixation de la protéine [Anderson M.P. *et al.*, 1991b; Cheung M. & Akabas M.H., 1997]. La conductance unitaire de CFTR est comprise entre 7 et 10 pS selon la concentration en ions, la température et le type cellulaire. Un unique travail montre que CFTR possède en fait deux conductances: une grande d'environ 9,2 pS due à la première partie de la protéine et une petite d'environ 3,8 pS due à la seconde partie de la protéine, suggérant que CFTR possède deux pores [Yue H. *et al.*, 2000]. Cependant, ces résultats sont très controversés et nécessitent d'être vérifiés.

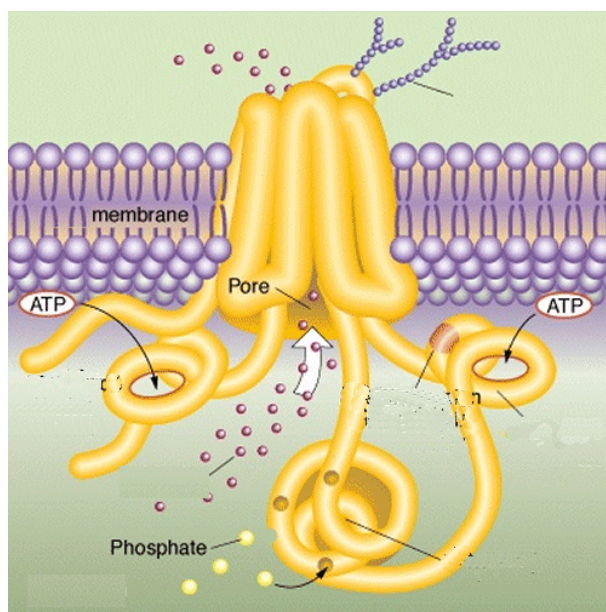


FIGURE I11: Représentation schématique du modèle structural 3D du canal CFTR. D'après <http://prometheus.mse.uiuc.edu/glossary/cf/>

Il a aussi été démontré que le pore de CFTR est capable de laisser passer plusieurs anions simultanément, y compris des anions polyatomiques avec la séquence de perméabilité suivante : $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$ [Tabcharani J.A. *et al.*, 1993 ; Linsdell P. *et al.*, 1997]. De même, CFTR semble être perméable au glutathion, peptide impliqué dans la protection cellulaire contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène [Roum J.H. *et al.*, 1993 ; Kogan I. *et al.*, 2003].

iii. RÉGULATION DE CFTR

A 37°C, la durée d'ouverture du canal CFTR est comprise entre 100 et 250 ms et elle est régulée par des mécanismes impliquant des étapes de phosphorylation, de liaison puis d'hydrolyse d'ATP. Il existe plusieurs modèles de régulation du canal, mais le plus connu est

probablement celui établi par l'équipe de Gadsby, s'appuyant sur des études structure-fonction. Celui-ci propose que des changements de conformation du domaine R, après phosphorylation, permettent le passage des ions Cl^- . La levée de l'inhibition imposée par l'état déphosphorylé du domaine R stimule l'interaction entre l'ATP et les domaines NBDs [Gadsby D.C. *et al.*, 2006]. La première étape d'activation du canal passe par une phosphorylation par les PKA. Il est très probable que le degré de phosphorylation du canal détermine sa probabilité d'ouverture, mais, bien que les résidus phosphorylables du domaine R soient connus, ceux impliqués dans l'ouverture et la fermeture restent incertains [Hwang T.C. *et al.*, 1994]. Les cinétiques de phosphorylation sont aussi influencées par la structure locale de la protéine CFTR, ainsi que par la proximité et l'activité sélective des phosphatases endogènes de la cellule. De même, il a été démontré que l'activité des PKC stimule la phosphorylation ultérieure par la PKA [Tabcharani J.A. *et al.*, 1991 ; Yurko-Mauro K.A. & Reenstra W.W., 1998]. Ces données suggèrent qu'une phosphorylation de base par les PKA et les PKC est nécessaire pour entraîner l'activation du canal, en agissant sur des sites de phosphorylation essentiels. Après phosphorylation par les PKA, la déphosphorylation par des protéines phosphatases inactive le canal [Becq F. *et al.*, 1993]. A l'inverse, l'inhibition des protéines phosphatases endogènes augmente l'efficacité de stimulation du canal CFTR et ralentit son retour à l'état désactivé. La deuxième étape de régulation du canal consiste en la liaison et l'hydrolyse de l'ATP sur les NBDs, entraînant ainsi une modification conformationnelle des domaines transmembranaires du canal. L'hydrolyse de l'ATP représente l'étape limitante à la fois pour l'ouverture et la fermeture du canal (**FIGURE I12**) [Gadsby D.C. & Nairn A.C., 1999].

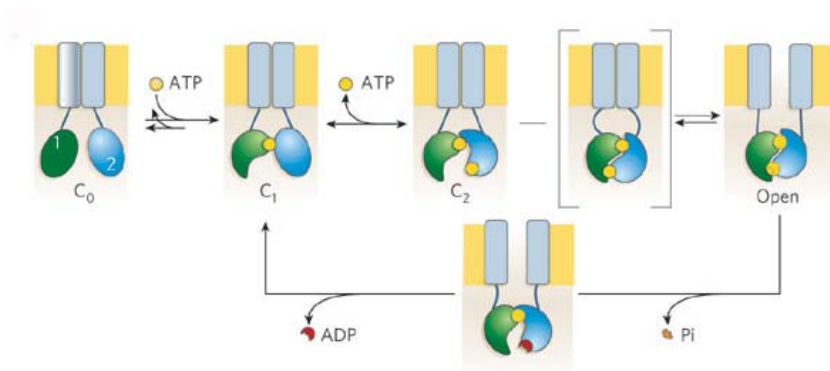


FIGURE I12: Modèle proposé pour la régulation de l'ouverture et de la fermeture ATP-dépendant du canal CFTR phosphorylé. Les TMDs sont représentés en bleu clair, NBD1 en vert et NBD2 en bleu foncé. C₀: CFTR au repos, C₁: fixation d'ATP sur NBD1, C₂: fixation d'ATP sur NBD2, puis dimérisation, ouverture du canal avant hydrolyse d'ATP par NBD2 et fermeture du canal (retour à C₁). D'après Gadsby D.C. *et al.*, 2006.

2. CFTR EST UNE PROTÉINE DE REGULATION

Parmi les membres de la superfamille des transporteurs ABC, certains ont été décrits comme régulateurs d'autres protéines. C'est par exemple le cas du récepteur aux sulfonylurées SUR1, impliqué dans la régulation du canal Kir6.2, un canal potassique rectifiant sortant. Ces canaux, dépendants de l'ATP et appelés K_{ATP} , sont constitués de 4 sous-unités de Kir6.2 composant le canal, et de 4 sous-unités régulatrices de SUR1 [Inagaki N. *et al.*, 1995 ; Clement J.P. 4th *et al.*, 1997 ; Shyng S. & Nichols C.G., 1997]. La régulation repose en fait sur la fixation différentielle des nucléotides sur chacune des sous-unités. La fixation d'ATP sur Kir6.2 inhibe en effet le canal, alors que la fixation de Mg-ATP ou d'ADP sur SUR1 l'active [Tanabe K. *et al.*, 1999].

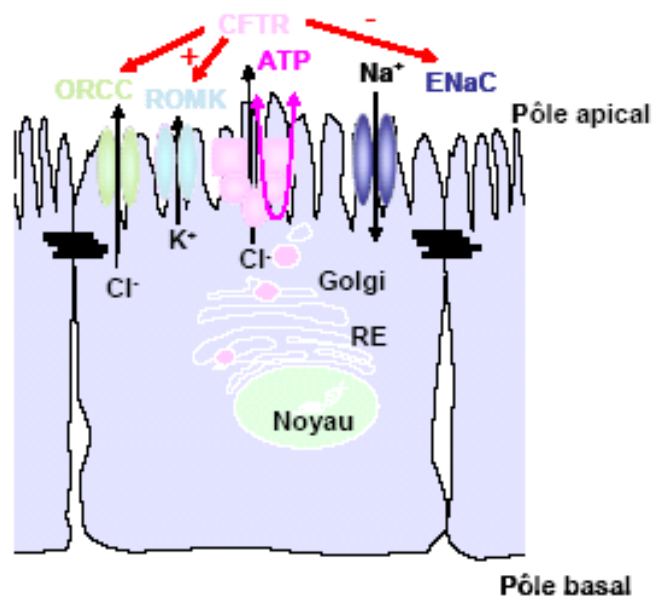


FIGURE I13: Schéma représentant les principaux canaux ioniques régulés par CFTR. Modifié d'après Schwiebert E.M. *et al.*, 1999.

Le nom « régulateur transmembranaire de conductance » donné à la protéine codée par le gène *CFTR* était basé sur le classement de nombreuses anomalies au sein des épithélia mucoviscidosiques, incluant la régulation déficiente d'autres canaux Cl⁻ comme ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*) [Egan M. *et al.*, 1992 ; Gabriel S.E. *et al.*, 1993] ou encore du canal Na⁺ sensible à l'amiloride, ENaC (*Epithelial Na⁺ Channel*) [Knowles M.R. *et al.*, 1981 ; Quinton P.M. *et al.*, 1983 ; Boucher R.C. *et al.*, 1986 ; Stutts M.J. *et al.*, 1995]. La perte de l'activité Cl⁻, sans doute indirectement impliquée dans le transport d'eau et d'ions [Quinton P.M., 1983 ; Anderson M.P. *et al.*, 1991b ; Bear C.E. *et al.*, 1991], n'étant pas suffisante pour expliquer les dysfonctionnements épithéliaux observés, l'hypothèse d'une fonction régulatrice a été émise. Ces modèles de régulation par CFTR sont surtout basés sur

son appartenance à la superfamille des ABC et sur sa capacité à fixer des protéines contenant des domaines PDZ [Short D.B. *et al.*, 1998]. La **FIGURE 113** montre les différents canaux ou transporteurs ioniques possiblement régulés par CFTR.

i. LES CANAUX ORCC

Depuis 1983, il est connu que la mucoviscidose est en grande partie due à un défaut de transport des ions Cl^- à travers les cellules épithéliales [Quinton P.M., 1983]. L'ORCC étant un canal Cl^- régulé par l'AMPc et inactif en cas de mucoviscidose, il n'était donc pas étonnant qu'il ait été incriminée dans la maladie. Cependant, des études ont montré que l'ORCC était bien impliqué dans la conductance membranaire, mais ne fonctionnait qu'en présence du canal Cl^- CFTR [Schwiebert E.M. *et al.*, 1994]. La régulation d'ORCC par la protéine CFTR, *via* les kinases, se fait par un mécanisme autocrine/paracrine impliquant le transport d'ATP contrôlé par CFTR dans le milieu extracellulaire. L'ATP ainsi relâché se lie aux récepteurs purinergiques P2R pour stimuler ORCC [Schwiebert E.M. *et al.*, 1995]. La prévention de la formation d'AMPc inhibe le couplage réactionnel entre CFTR et ORCC [Schwiebert E.M. *et al.*, 1998], alors que la surexpression de CFTR restaure l'efflux de chlorure sensible à l'AMPc d'ORCC [Egan M. *et al.*, 1992]. La régulation de l'ORCC par CFTR est aussi démontrée par le fait que l'activité de l'ORCC est fortement augmentée en présence de PKA, PKC (*Protéine Kinase C*) et ATP. ORCC n'étant pas directement activé par ces composés, CFTR actif est donc très important pour l'activité maximale de ce canal [Gabriel S.E. *et al.*, 1993 ; Jovov B. *et al.*, 1995 ; Schwiebert E.M. *et al.*, 1998].

Le phénomène de régulation de l'ORCC par CFTR a été étudié grâce à des troncations de CFTR, qui ont permis de montrer que les domaines de CFTR nécessaires au transport des ions Cl^- et à la régulation d'autres protéines ne sont pas les mêmes. La moitié de CFTR composée de TMD1-NBD1-R (TNR-CFTR) a une perméabilité aux ions Cl^- et régule ORCC *via* l'export d'ATP de manière directe ou indirecte, alors que le TMD1 seul possède une activité canal Cl^- mais n'a pas d'activité régulatrice d'ORCC. Ces résultats suggèrent que ce sont les domaines NBD1 et R de CFTR qui sont impliqués dans la régulation de l'ORCC [Schwiebert E.M. *et al.*, 1998].

ii. LES CANAUX ENaC

Le canal ENaC sensible à l'amiloride assure l'absorption des ions à travers la membrane apicale des cellules épithéliales.

L'absorption accrue d'ions Na^+ dans les épithelia de patients atteints de mucoviscidose est décrite depuis longtemps [Knowles M.R. *et al.*, 1983 ; Boucher R.C. *et al.*, 1986]. En effet, l'absence de CFTR à la membrane entraîne une augmentation de l'absorption apicale de Na^+ sensible à l'AMPc, et ce très certainement en levant l'inhibition que provoque CFTR sur ENaC [Stutts M.J. *et al.*, 1995].

Cependant, la relation entre CFTR et ENaC ne s'arrête pas au simple rôle répresseur de CFTR. En effet, quand ENaC est co-exprimé avec le canal CFTR dans l'ovocyte de Xénope, l'effet de l'AMPc sur ENaC est modifié. Ceci se traduit par l'activation de CFTR *via* l'AMPc tout en maintenant l'inhibition d'ENaC [Mall M. *et al.*, 1996 ; Chabot H. *et al.*, 1999]. Comme ENaC et CFTR sont coexprimés naturellement dans les cellules épithéliales, la conductance Na^+ peut être inhibée par l'activation de CFTR avec comme conséquence d'une part la diminution de l'absorption en électrolyte et d'autre part l'inversion du flux de NaCl. L'inhibition d'ENaC par CFTR, dans les épithelia des voies respiratoires [Mall M. *et al.*, 1998] et du colon [Mall M. *et al.*, 1999], reflète l'importance du mécanisme par lequel les voies peuvent passer de l'absorption à la sécrétion.

Les bases moléculaires de la régulation négative d'ENaC par CFTR sont très controversées. A ce jour quatre hypothèses existent :

- Comme dans le cas de la régulation d'ORCC, le canal CFTR serait impliqué dans l'export de l'ATP intracellulaire. Ce dernier inhiberait le transport transépithélial de Na^+ par l'activation de la phospholipase C et de la PKC liée au récepteur purinergique P2R [Schreiber R. *et al.*, 1999a].
- CFTR serait en interaction directe avec une ou plusieurs sous-unités d'ENaC. Des analyses de double hybride menées par Kunzelmann et ses collaborateurs ont montré que les domaines NBD1 et R de CFTR étaient capables d'interagir directement avec la partie carboxyterminale d'ENaC [Kunzelmann K. *et al.*, 1997a]. Ils ont également mené des expériences de troncation de CFTR et ont mis en évidence que NBD1 est essentiel à la régulation négative d'ENaC [Schreiber R. *et al.*, 1999a]. De plus la mutation G551D située dans le NBD1 rompt cette interaction [Stutts M.J. *et al.*, 1995].
- CFTR et ENaC interagiraient *via* des éléments associés à la membrane et au cytosquelette. Ce serait cette interaction indirecte qui permettrait à CFTR d'interférer avec la régulation d'ENaC *via* la PKA. Le mécanisme est encore inconnu. Toutefois il a été montré que les canaux CFTR [Cantiello H.F., 1996] et ENaC [Berdiev B.K. *et al.*, 1996] sont affectés par les interactions avec les

protéines du cytosquelette comme l'actine. Ainsi, l'expression variable d'une protéine régulatrice ou d'une protéine liant CFTR ou ENaC au cytosquelette permettrait d'expliquer la régulation tissus spécifique d'ENaC par CFTR. L'actine pourrait être une de ces protéines [Schwiebert E.M. *et al.*, 1999]. Renforçant cette hypothèse, une étude récente effectuée sur des cellules MDCKI stablement transfectées par ENaC et CFTR a permis de montrer que CFTR régule non seulement l'activité d'ENaC mais aussi sa stabilité à la membrane plasmique [Lu C. *et al.*, 2007].

- Les canaux CFTR et ENaC n'interagiraient pas directement entre eux et la régulation se ferait par couplage électrochimique. L'activation de CFTR modifierait le potentiel de membrane, ce qui altérerait le flux d'ions Na^+ (Nagel G. *et al.*, 2001).

Dans les épithélia respiratoires et intestinaux, l'activité d'ENaC est inhibée par CFTR. Cependant, des études ont montré que dans les glandes sudoripares, épithélium purement absorbant, l'activité d'ENaC augmente avec l'activité de CFTR [Reddy M.M. & Quinton P.M., 2003]. Les études menées suggèrent que dans ce cas-ci, ni la phosphorylation, ni l'ATP ne sont nécessaires à l'activation d'ENaC par CFTR. Toutefois, cette activation requiert la fonction canal Cl^- . De plus les auteurs ont montré que l'activation d'ENaC n'est pas due à l'AMPc ou aux protéines G mais plutôt à la fonction canal Cl^- de CFTR [Reddy M.M. & Quinton P.M., 2006]. Il semblerait donc que la direction du courant Cl^- influence le mécanisme d'interaction entre CFTR et ENaC puisque ENaC est activé lorsque le Cl^- est absorbé, alors qu'ENaC est inhibé lorsque le Cl^- est sécrété.

Récemment, une étude basée sur des techniques de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) et de coimmunoprécipitation, a montré une interaction directe entre CFTR et ENaC [Berdiev B.K. *et al.*, 2007]. Ce travail reste toutefois unique et nécessite d'être approfondi.

iii. LES CANAUX ROMK

La sécrétion d'ions K^+ est assurée par une famille de canaux appelés Kir (*K^+ Inward Rectifier channel*) qui comprend les canaux K_{ATP} , les canaux Kir6.x et les canaux rénaux ROMK (*Renal Outer Medullary K^+ channel*) 1, 2 et 3. Ces derniers sont impliqués dans le recyclage du K^+ au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales rénales. Cependant des canaux similaires ont aussi été retrouvés au niveau des voies respiratoires [Loussouarn G. *et al.*, 1996].

L'expression et la fonction de ROMK sont régulées par un grand nombre de facteurs comme le pH intracellulaire, les niveaux d'ATP intra- et extracellulaire et les molécules sulfonylurées (glibenclamide, tolbutamide). Les récepteurs aux sulfonylurées SUR1 et SUR2, autres transporteurs ABC, confèrent généralement la sensibilité au glibenclamide du canal K_{ATP} et augmente l'interaction ATP dépendante entre les sous-unités Kir6.x [Inagaki N. *et al.*, 1995]. Cependant, l'absence de sous-unité SUR dans le rein [Aguilar-Bryan L. *et al.*, 1995] a suggéré la présence d'un autre élément de régulation pour ces canaux, probablement CFTR, surexprimé dans cet organe [Benharouga M. *et al.*, 1996 & 1997 ; Morales M.M. *et al.*, 1996]. Des études *in vitro* suggèrent que CFTR est nécessaire à l'inhibition de ROMK par l'ATP cytosolique et le glibenclamide [Rudnudin A. *et al.*, 1998]. Les études concernant l'effet de CFTR sur la fonction de ROMK laissent penser d'une part, que l'interaction de ces protéines se fait *via* des protéines à domaine PDZ comme NHE-RF [Yoo D. *et al.*, 2004], et d'autre part, que cet effet requiert le TMD1, le NBD1 et le domaine R de CFTR [McNicholas C.M. *et al.*, 1997 ; Cahill P. *et al.*, 2000].

L'équipe d'Hebert a aussi montré que la protéine CFTR située à la membrane plasmique confère la sensibilité de ROMK à l'ATP dans le rein de souris [Lu M. *et al.*, 2006]. Toutes ces observations permettent de suggérer que l'interaction entre CFTR et ROMK est similaire à ce qui a déjà été observé pour les canaux K_{ATP} . Ces résultats suggèrent un modèle général pour la régulation des canaux K^+ par les ABC. La seule différence ici est que l'interaction n'est pas directe mais fait intervenir probablement des protéines intermédiaires [Lu M. *et al.*, 2006].

iv. LES AQUAPORINES

Les aquaporines (AQPs) sont des canaux constitués de six hélices α transmembranaires facilitant le transport bidirectionnel de l'eau à travers les membranes. Les AQPs sont impliquées dans un nombre croissant de fonctions de l'épithélium [Verkman A.S., 2005]. Il existe une différence de perméabilité à l'eau après l'activation de CFTR par l'AMPc dans les ovocytes de xénope [Schreiber R. *et al.*, 1997], suggérant que CFTR serait impliqué dans la régulation d'un canal transportant l'eau. En 1999, cette même équipe a montré que ce canal était l'AQP3 [Schreiber R. *et al.*, 1999b]. Cependant, dans les cellules des voies aériennes, l'activation de la perméabilité à l'eau dépendante de CFTR n'a pas encore été démontrée. L'AQP9 de l'épididyme de rat a été cotransfectée avec CFTR dans des ovocytes de xénope [Cheung K.H. *et al.*, 2003]. Les auteurs observent alors une augmentation de la perméabilité à l'eau et il semble que le domaine NBD1 soit essentiel pour cette activité. D'autres

aquaporines comme AQP1 et AQP5 ont été colocalisées avec CFTR dans les cellules pancréatiques humaines [Burghardt B. *et al.*, 2003] et dans les cholangiocytes (cellules hépatiques du canal biliaire) où AQP1 colocalise avec CFTR et l'échangeur d'anions AE2 (Anion Exchanger 2) [Banales J.M. *et al.*, 2006]. Ces cellules épithéliales permettent en fait la dilution et l'alcalinisation de la bile. CFTR jouerait donc un rôle important dans ces processus *via* son activation AMPc-dépendante permettant ainsi la sécrétion de Cl^- et de HCO_3^- . En effet, l'AMPc induit un trafic coordonné de vésicules contenant CFTR, AQP1 et AE2 vers la membrane luminale des cholangiocytes, assurant ainsi un mouvement passif d'eau et de bicarbonate [Banales J.M. *et al.*, 2006].

Dans l'épithélium de la cornée, CFTR et les AQPs interagissent aussi. Le transport de fluide implique généralement un transport secondairement actif de Cl^- créant le gradient osmotique nécessaire au transport transépithélial de l'eau [Hamann S., 2002]. Les profils d'expression des AQPs et de CFTR dans l'épithélium de la cornée et de la rétine suggèrent leurs implications dans la régulation du volume des larmes, des fluides aqueux et de la pression locale [Da T. & Verkman A.S., 2004]. Les patients mucoviscidosiques souffrent quelque fois d'oedèmes cornéens, de décollements de la rétine ou d'altérations de l'hydratation de la surface de l'oeil, confirmant l'importance de CFTR dans le transport d'eau *via* les AQPs. Reigada et Mitchell ont montré que le canal CFTR était fonctionnel dans l'épithélium de la cornée et de la rétine [Reigada D. & Mitchell C.H., 2005]. La régulation de la sécrétion active de Cl^- et de l'absorption du Na^+ détermine la sécrétion d'eau et des larmes. Le mode d'interaction entre CFTR et les AQPs n'est pas encore bien défini. En plus de l'AMPc qui permet d'activer CFTR et les AQPs, Saxena et Kaur ont montré que les protéines GTPases Rab modulent la fonction de CFTR, des AQPs et d'ENaC [Saxena S.K. & Kaur S., 2006]. Très récemment, il a été démontré que CFTR était un régulateur important d'AQP9 et que l'interaction CFTR, NHERF1 et AQP9 devait faciliter l'activation d'AQP9 par l'AMPc [Pietrement C. *et al.*, 2008]. D'autres travaux ont montré que CFTR pouvait directement transporter l'eau, mais ces derniers n'ont pas été confirmés par la suite [Hasegawa H. *et al.*, 1992].

v. LES ÉCHANGES $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

Les ions bicarbonate (HCO_3^-) sont importants pour le maintien du pH intracellulaire. La sécrétion de HCO_3^- peut être assurée de deux façons. Soit par le couplage de CFTR et d'un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (ou d'un canal HCO_3^-), soit par CFTR lui-même [Seidler U. *et al.*,

1997]. Il a été montré que CFTR régulaient un échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dans des cellules surexprimant CFTR comme les NIH 3T3 ou HEK 293 mais également dans les tissus exprimant de façon endogène CFTR comme les conduits pancréatiques [Lee M.G. *et al.*, 1999a & b] ou dans les duodéna de rat et de lapin [Choi J.Y. *et al.*, 2001]. Il a aussi été démontré que CFTR actif à la membrane plasmique possédait une conductance aux ions HCO_3^- [Reddy M.M. *et al.*, 2001]. Ces résultats suggèrent un rôle des ions HCO_3^- dans la mucoviscidose et pourraient expliquer les insuffisances pancréatiques sévères rencontrées chez certains malades. En effet, l'absence d'alcalinisation du suc pancréatique conduit à l'activation précoce d'enzymes digestives qui détruisent le pancréas. Le HCO_3^- joue également un rôle primordial dans l'alcalinisation de la bile *via* la sécrétion active d'ions HCO_3^- par les cholangiocytes en réponse à la sécrétine. Le changement de pH intracellulaire induit par l'excrétion d' HCO_3^- dans la bile nécessite une régulation *via* des transporteurs ioniques comme CFTR. La fixation du glucagon sur son récepteur induit une augmentation du niveau d'AMPc intracellulaire qui active la PKA et stimule ainsi l'échangeur anionique AE2 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), permettant ainsi la diffusion d'eau *via* l'AQP. Le Cl^- ainsi importé dans la cellule va être excrété par CFTR à travers la membrane apicale permettant alors le maintien du gradient de Cl^- et l'activation de AE2 [Banales J.M. *et al.*, 2006].

vi. LE TRANSPORT D'ATP

Depuis longtemps, CFTR est soupçonné d'être impliqué dans le transport d'ATP [Reisin I.L. *et al.*, 1994]. Cependant, CFTR possède un diamètre minimal de seulement 5,3 Å [Hanrahan J.W. *et al.*, 1998] alors que l'ATP a une taille de 10,5 Å. Il semble donc impossible que ce canal transporte lui-même l'ATP à travers la membrane plasmique [Li C. *et al.*, 1996b ; Reddy M.M. *et al.*, 1996 ; Sugita M. *et al.*, 1998]. Il a ainsi été prouvé par la technique de patch-clamp que les flux d'ions Cl^- et d'ATP sont conduits par des canaux différents, CFTR régulant ce flux d'ATP de manière indirecte. L'équipe de Guggino a aussi démontré que la stimulation de CFTR par la PKA active le transport d'ATP extracellulaire. L'augmentation de la sécrétion d'ATP conduit à l'activation de l'ORCC *via* le récepteur purinergique P2Y2 directement ou *via* des protéines G [Schwiebert E.M. *et al.*, 1995]. L'ATP extracellulaire semble aussi intervenir dans la régulation de canaux Cl^- activés par le Ca^{2+} Cl_{Ca} [Hwang T.H. *et al.*, 1996]. Cependant, ces observations restent controversées.

vii. LES CANAUX CHLORURES CALCIUM-DÉPENDANTS

Il existe une famille de canaux Cl^- activés par les ions Ca^{2+} regroupés sous l'appellation CaCC (Ca²⁺-activated Chloride Channels). Cependant, ni les protéines, ni les gènes codant pour celles-ci ne sont connus. Ces canaux sont activés *via* des récepteurs purinergiques par les nucléosides présents au niveau apical des cellules épithéliales [Paradiso A.M. *et al.*, 2001] et sont impliqués dans le contrôle du volume du liquide mucociliaire [Tarran R. *et al.*, 2002]. Il a cependant été démontré que la présence de CFTR réduit cette activité, et que ce phénomène est amplifié par la surexpression CFTR [Kunzelmann K. *et al.*, 1997b ; Wei L. *et al.*, 1999]. Cette régulation négative nécessite un domaine R de CFTR intact, mais pas les séquences d'interaction avec les domaines PDZ [Wei L. *et al.*, 2001].

3. AUTRES FONCTIONS DE CFTR

CFTR, en plus de son rôle de transporteur d'ions Cl^- et de régulateurs de canaux, semble être impliqué dans de nombreux autres processus importants pour la cellule.

i. TRAFIC VÉSICULAIRE ET FUSION DES ENDOSOMES

Il est maintenant connu que chez les patients mucoviscidosiques, l'endocytose des récepteurs après fixation de leur ligand est affectée et pourrait être responsable de la protéinurie observée chez certains patients [Jouret F. *et al.*, 2007]. Dans des organes comme le pancréas, la mucoviscidose peut également affecter la sécrétion vésiculaire ATP-dépendante de mucus, étant donné que l'ATP n'est plus capable de stimuler la sécrétion de mucine dans un épithélium mucoviscidosique [Montserrat C. *et al.*, 1996]. En outre, l'expression et l'activation de CFTR favorisent la fusion des endosomes entre eux [Biwersi J. *et al.*, 1996]. Cet effet est dû au transport d'ions Cl^- , puisque la fusion est inhibée lorsque les ions Cl^- sont remplacés par du gluconate.

ii. RÉGULATION DU pH INTRACELLULAIRE

Il a depuis longtemps été remarqué que le pH dans les organelles des cellules mucoviscidosiques est beaucoup plus basique que celui des organelles de cellules saines [Barasch J. *et al.*, 1991; Elgavish A., 1991]. CFTR est en effet capable d'influencer le pH soit de manière indirecte, par l'intermédiaire d'échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de la famille SLC26, soit de manière directe, en acidifiant le pH de ces organelles. Ce rôle de CFTR est particulièrement important lors d'invasions bactériennes. En effet, dans les macrophages, les phagosomes contenant les bactéries phagocytées fusionnent avec des lysosomes pour former le

phagolysosome. Ces bactéries y sont donc détruites par des enzymes dont l'activité est optimale dans un environnement acidifié par l'intermédiaire, entre autre, de CFTR. Au contraire, dans les cellules malades, les bactéries phagocytées ne sont pas lysées et continuent à proliférer dans les phagolysosomes [Di A. *et al.*, 2006]. Cependant, l'étude ayant amené à ce résultat a été récemment contredite et le débat reste ouvert [Haggie P.M. & Verkman A.S., 2007].

Dans les cellules épithéliales pulmonaires, le même phénomène a lieu. En effet, à cause de l'absence de CFTR et de son rôle dans l'acidification du pH, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ne sont pas digérés dans les épithélia mucoviscidosiques, alors qu'ils le sont dans les épithélia sains [Jarry T.M. & Cheung A.L., 2006 ; Kong F. *et al.*, 2006].

iii. RÔLE DANS L'INFECTION ET L'INFLAMMATION

Par le rôle qu'il joue dans l'acidification des organelles intracellulaires, phénomène nécessaire à l'élimination des bactéries, CFTR serait indirectement impliquée dans le système immunitaire et dans le processus d'infection/inflammation observé chez les patients. Il a aussi été démontré que CFTR joue un rôle de récepteur pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhi* [Pier G.B. *et al.*, 1997 & 1998]. Récemment, il a été mis en évidence l'implication de CFTR dans la mise en place de la réaction immunitaire contre l'invasion de *Pseudomonas aeruginosa*. L'association entre la bactérie et CFTR va en effet entraîner le recrutement de la protéine MVP (Major Vault Protein ou LRP, Lung Resistance-related Protein) puis l'internalisation de la bactérie provoquant ainsi l'activation du facteur nucléaire NFκB (Nuclear Factor κ B). Ce phénomène conduit alors à l'apoptose de la cellule infectée et à l'élimination de l'infection bactérienne [Schroeder T.H. *et al.*, 2002 ; Cannon C.L. *et al.*, 2003]. Chez les malades atteints de mucoviscidose, l'absence de CFTR rompt cette cascade de réactions initiant la réponse immunitaire précoce, ce qui conduit à la colonisation des voies aériennes par cette bactérie pathogène opportuniste.

4. CFTR INTERAGIT AVEC D'AUTRES PROTÉINES

iii. INTERACTIONS PAR L'INTERMÉDIAIRE DE LA PARTIE N-TERMINALE

La partie N-terminale de CFTR est capable d'interagir avec différentes protéines qui jouent un rôle important dans la régulation du canal CFTR.

Tout d'abord, il a été démontré depuis une dizaine d'années que CFTR était capable d'interagir avec des protéines de la famille SNARE (SNAp REceptor), impliquées dans le

trafic cellulaire et en particulier la fusion vésiculaire [Sollner T. *et al.*, 1993]. Parmi ces protéines, la syntaxine 1A est capable d'interagir avec la partie N-terminale de CFTR, inhibant ainsi le courant Cl^- activé par l'AMPc [Naren A.P. *et al.*, 1997 & 1998]. Cette inhibition pourrait s'expliquer par le fait que la syntaxine 1A, en se liant à la partie N-terminale de CFTR, romprait les interactions interdomaines de la protéine (partie N-terminale-R ou NBD1 notamment), nécessaires au bon fonctionnement du canal [Naren A.P. *et al.*, 1999]. Les résidus essentiels impliqués dans l'interaction spécifique entre CFTR et la syntaxine 1A ont été identifiés. Il s'agit d'acides aminés hydrophiles localisés dans le domaine H3, S225 et E238 [Ganeshan R. *et al.*, 2003].

Il a aussi été montré que la syntaxine 8, impliquée dans la transition des endosomes précoces en endosomes tardifs, inhibe l'activité canal Cl^- de CFTR ainsi que son export vers la membrane plasmique. Cependant, cette liaison est beaucoup plus faible que l'interaction CFTR/syntaxine 1A, et semble se faire par une interaction directe ou *via* un complexe de protéines [Bilan F. *et al.*, 2004].

Récemment, l'équipe de Milgram a montré que la partie N-terminale de CFTR interagit directement avec les filamines, protéines impliquées dans le pontage des molécules d'actine, montrant ainsi un lien direct entre CFTR et le cytosquelette. L'association CFTR/filamines semble être impliquée dans la régulation de l'ancrage et de la stabilisation de CFTR à la membrane plasmique [Thelin W.R. *et al.*, 2007].

iv. INTERACTIONS PAR L'INTERMÉDIAIRE DE LA PARTIE C-TERMINALE

Les domaines PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) sont des motifs d'environ 90 acides aminés retrouvés chez toutes les espèces et permettant des interactions avec le domaine carboxy-terminal des protéines cibles. Les domaines PDZ régulent les interactions protéine-protéine, les clusters de protéines et la co-localisation de transporteurs, de canaux et de protéines de signalisation au niveau des sous-domaines cellulaires.

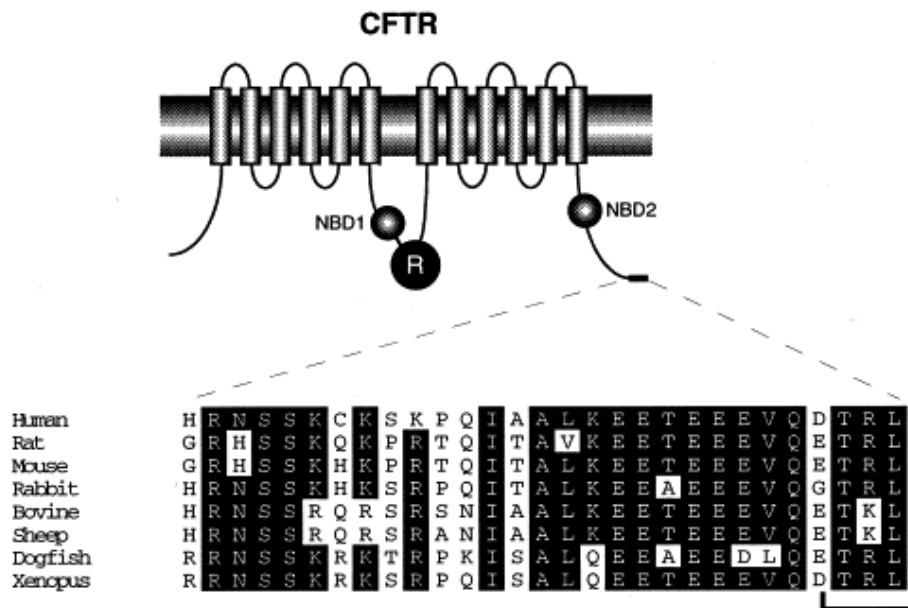


FIGURE I13: Schéma de la structure prédite de CFTR et alignement des séquences de la partie C-terminale du canal provenant de différentes espèces. Modifié d'après Wang S. *et al.*, 1998.

Le canal CFTR interagit avec de nombreux canaux et transporteurs impliqués dans sa régulation, que ce soit au niveau de son expression, de son trafic ou de sa fonction. Le domaine C-terminal de CFTR possède une séquence consensus DTRL, située entre les résidus 1477 et 1480, reconnue par des domaines PDZ (**FIGURE I13**) [Wang S. *et al.*, 1998 ; Short D.B. *et al.*, 1998]. Cette extrémité est très conservée chez différentes espèces et n'est pas indispensable à l'activité canal Cl^- de CFTR mais l'est pour sa localisation apicale [Moyer B.D. *et al.*, 2000] et sa stabilité [Haardt M. *et al.*, 1999]. A l'heure actuelle, 5 protéines possédant des domaines PDZ sont capables de se lier à CFTR :

- NHE-RF 1 [Hall R.A. *et al.*, 1998] et 2 [Short D.B. *et al.*, 1998].
- CAP70 (*CFTR Associated Protein-70*) [Wang S. *et al.*, 2000].
- CAL [Cheng J. *et al.*, 2002].
- IKEPP (*Intestinal and Kidney Enriched PDZ Protein*) [Hegedüs T. *et al.*, 2003].

Ces protéines associées à CFTR forment alors un complexe multiprotéique impliqué dans la régulation de CFTR [Guggino W.B., 2004; Li C. & Naren A.P., 2005; Riordan J.R., 2005].

L'interaction entre CFTR et les protéines NHE-RF1 et 2 par l'intermédiaire de leurs domaines PDZ favorise en fait une régulation réciproque des différentes protéines. Ainsi, par l'intermédiaire de NHE-RF1, CFTR interagit avec le récepteur β_2 -adrénergique [Naren A.P. *et al.*, 2003] et par l'intermédiaire de NHE-RF2, celui-ci interagit avec le récepteur à l'acide lysophosphatidique de type 2 (LPA2-R) [Li C. *et al.*, 2005]. Très récemment, l'équipe de Naren a aussi montré un couplage entre le transport d'AMPc par MRP4 et l'activité de CFTR

dans l'épithélium intestinal, par l'intermédiaire de la protéine PDZK1/CAP70 [Li C. *et al.*, 2007]. La partie C-terminale de CFTR est donc impliquée à la fois dans la régulation de la protéine elle-même et dans la régulation d'autres protéines.

La première protéine PDZ à avoir été identifiée comme interagissant avec CFTR est l'isoforme 1 du NHE-RF et son homologue humain EBP50 (*Ezrin Binding Protein 50*) [Short D.B. *et al.*, 1998]. NHE-RF1 et 2 possèdent dans leur partie C-terminale, un domaine ERM (*Ezrin, Radixin, Moesin*) qui se lie à l'eitrine, permettant aux protéines liées à NHE-RF d'interagir avec l'actine au niveau de la partie apicale de la cellule. L'équipe de Verkman a montré par des expériences de FRAP (*Fluorescence Recovering After Photobleaching*) que les domaines PDZ de NHE-RF interagissent avec CFTR au niveau de la membrane plasmique de manière extrêmement dynamique [Haggie P.M. *et al.*, 2004]. Cette interaction inhibe l'activité et la perméabilité aux ions Cl⁻ de CFTR [Benharouga M. *et al.*, 2003]. La présence de ce domaine PDZ laisse suggérer une possible dimérisation de CFTR *via* ce domaine (**FIGURE I14**). Cette dimérisation, induite par l'interaction entre CFTR et le complexe NHE-RF1/CAP70, semble améliorer la fonction canal Cl⁻ de CFTR [Wang S. *et al.*, 2000; Raghuram V. *et al.*, 2001]. Cependant, jusqu'à présent, l'existence d'une forme dimérique de CFTR n'a pas été démontrée.

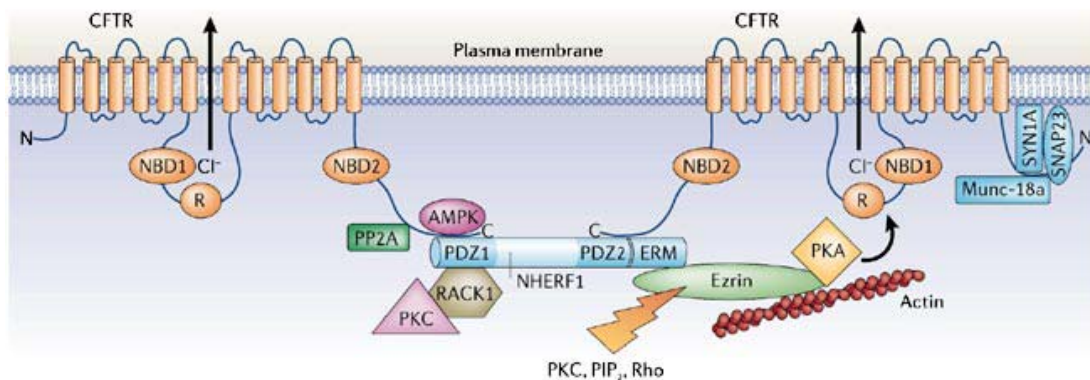


FIGURE I14: Illustration de la dimérisation de CFTR par l'intermédiaire du complexe multiprotéique créé par la protéine NHE-RF1. D'après Guggino W.B. & Stanton B.A., 2006.

La compétition entre CAL et NHE-RF1 pour la fixation au motif DTRL de CFTR a aussi été étudiée. Au niveau de l'appareil de Golgi, l'association entre CAL et la partie C-terminale de CFTR a tendance à séquestrer la protéine à l'intérieur de la cellule et à la conduire à la dégradation par le lysosome, alors que l'association entre NHE-RF1 et la partie C-terminale de CFTR semble faciliter le trafic de la protéine vers la membrane plasmique [Cheng J. *et al.*,

2002 & 2004]. La balance de l'association entre ces deux protéines et CFTR semble donc être à la base de la régulation du trafic de CFTR de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. De même, il a été montré qu'il existait une compétition dynamique entre NHE-RF1 et la protéine Shank2 pour la fixation à la partie C-terminale de CFTR au niveau de la membrane plasmique. Cette compétition existante entre les deux protéines semble être impliquée dans le maintien de l'homéostasie du transport épithélial d'ions et de fluides [Lee J.H. *et al.*, 2007].

Il a aussi été récemment montré que NHE-RF1 serait impliqué dans la stabilisation de la protéine CFTR-F508del après correction de son défaut d'adressage. Cependant, cet effet n'est pas suffisant pour que la demi-vie de cette protéine à la membrane plasmique soit identique à celle de la protéine sauvage [Kwon S.-H. *et al.*, 2007], tout en étant capable de corriger le défaut d'adressage de CFTR-F508del et donc de restaurer la conductance des ions Cl⁻ [Bossard F. *et al.*, 2007].

Il est aussi très probable que la phosphorylation activatrice de CFTR dépende de son interaction avec des protéines telles que PKA, PP2A (*Protéine Phosphatase 2A*) ou PKC au sein d'un complexe macromoléculaire formé par les interactions *via* les domaines PDZ. Il a, par exemple, été démontré que PP2A, impliquée dans la déphosphorylation du domaine R, se fixait à la partie C-terminale de CFTR par l'intermédiaire de sa séquence DTRL [Thelin W.R. *et al.*, 2005].

X. LA PROTÉINE CFTR MUTÉE F508del

A. GENERALITES

La mutation la plus fréquente rencontrée chez les malades atteints de mucoviscidose correspond à la délétion d'une phénylalanine en position 508 (F508del) de CFTR. Cette mutation de classe II est présente chez ~70% des malades atteints de mucoviscidose [Kerem B.-S. *et al.*, 1989] et a été identifiée sur au moins 1 allèle chez 90% des patients. Cette mutation est responsable d'un phénotype sévère avec une durée de vie, sans traitement, n'excédant pas 10 à 15 ans. A 37°C, dans un contexte normal, 70% des protéines néosynthétisées sont séquestrées au niveau du RE et sont rapidement dégradées au niveau du RE. Cependant dans un contexte F508del, c'est environ 99% des protéines néosynthétisées qui sont reconnues comme mal repliée par le système ERQC. Celles-ci sont alors retenues [Cheng S.H. *et al.*, 1990 ; Yang Y. *et al.*, 1993 ; Lukacs G.L. *et al.*, 1994 ; Ward C.L. & Kopito R.R., 1994] puis dégradées par divers systèmes au niveau de RE [Ward C.L. & Kopito

R.R., 1994 ; De Keukeleire B. *et al.*, 2008] (**Figure I15**). Ce défaut d'adressage est à l'origine de l'absence de perméabilité aux ions Cl^- [Berger H.A. & Welsh M.J., 1991]. Il est à noter que la protéine CFTR-F508del reste fonctionnelle malgré son blocage majoritaire dans le RE, confirmant que le seul défaut apporté par la mutation est un défaut d'adressage [Dalemans W. *et al.*, 1991 ; Drumm M.L. *et al.*, 1991 ; Pasyk E.A. & Foskett J.K., 1995].

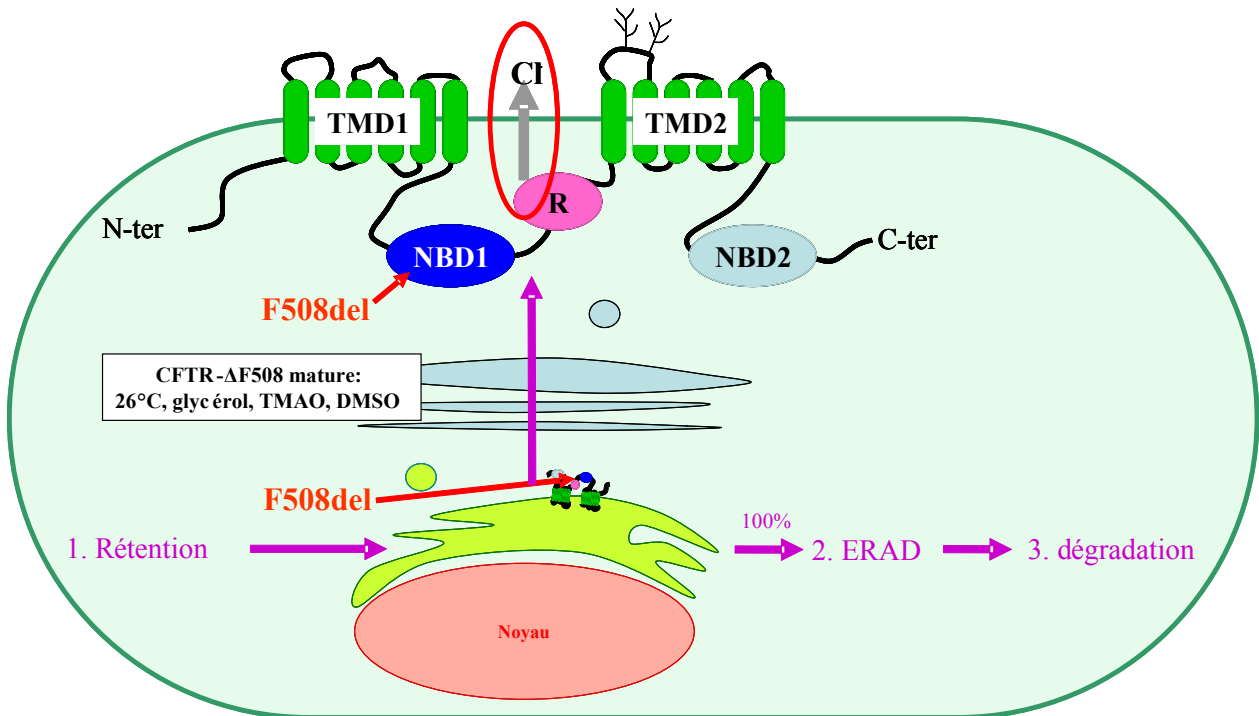


FIGURE I15: Biosynthèse de la protéine CFTR-F508del. La protéine est retenue à 99% dans le RE où elle est dégradée. Des traitements physicochimiques peuvent cependant restaurer l'adressage de la protéine vers la membrane.

B. MATURATION ARTIFICIELLE DE CFTR-F508del

Différents procédés ont été utilisés pour restaurer l'adressage de la protéine CFTR-F508del vers la membrane plasmique. Ainsi, l'abaissement de la température à 26°C [Denning G.M. *et al.*, 1992a ; Sharma M. *et al.*, 2001] ou l'utilisation des chaperonnes chimiques comme le glycérol, le DMSO (*diméthylsulfoxyde*) ou le TMAO (*triméthylamine N-oxide*) [Brown C.R. *et al.*, 1996 ; Sato S. *et al.*, 1996 ; Fischer H. *et al.*, 1998] ont permis de corriger le défaut d'adressage de CFTR muté (**FIGURE I15**). Principalement utilisé dans les études, le glycérol est connu depuis longtemps pour stabiliser le niveau de conformation des protéines [Gekko K. & Morikawa T., 1981] et faciliter leur repliement *in vitro* [Sawano H. *et al.*, 1992]. Lorsque les cellules exprimant CFTR-F508del sont traitées avec du glycérol, la forme mature de la protéine est visible, et la conductance Cl^- dépendante de l'AMPc est partiellement restaurée [Brown C.R. *et al.*, 1996 ; Sato S. *et al.*, 1996]. L'activité est cependant réduite en raison de la

diminution de la probabilité d'ouverture du canal [Haws C.M. *et al.*, 1996]. L'hypothèse la plus probable est que le glycérol stabilise le précurseur de la protéine dans une conformation capable de tromper le système ERQC. Récemment, il a été montré que la restauration de l'adressage de CFTR-F508del vers la membrane plasmique par l'abaissement de la température se fait de manière Golgi-indépendante et engendre la présence à la fois de protéines matures et immatures au niveau de la membrane plasmique [Rennolds J. *et al.*, 2008].

Il est aussi possible de corriger le défaut d'adressage de CFTR mutée en utilisant des le sodium-4-phénylbutyrate (4PBA). Ce dernier est un dérivé non toxique du butyrate de sodium, régulateur transcriptionnel connu pour permettre la surexpression de CFTR. Il agit sur son promoteur dépendant de la metallothionéine [Cheng S.H. *et al.*, 1995], et induit la maturation, l'adressage membranaire et la restauration de la conductance Cl^- AMPc-dépendante [Rubenstein R.C. *et al.*, 1997]. Le 4PBA agit sur CFTR-F508del probablement en modifiant l'interaction entre celle-ci et les protéines chaperonnes Hsc70 et Hsp70 [Rubenstein R.C. & Lyons B.M., 2001 ; Choo-Kang L.R. & Zeitlin P.L., 2001].

En plus du glycérol, du DMSO, du TMAO et du 4PBA, il existe de nombreuses autres molécules pharmacologiques permettant l'export de CFTR-F508del vers la membrane plasmique [Egan M.E. *et al.*, 2002 & 2004 ; Norez C. *et al.*, 2006].

La restauration de l'adressage à la membrane plasmique d'une protéine CFTR-F508del fonctionnelle par abaissement de la température ou par ajout de chaperonnes chimiques suggère qu'un mauvais repliement de CFTR est à l'origine de ce défaut d'adressage. Malheureusement, lorsque cette protéine est présente à la membrane plasmique, elle est instable. Celle-ci est en effet rapidement internalisée et dégradée dans le cytoplasme par la voie ubiquitine/protéasome et la voie lysosomiale [Lukacs G.L. *et al.*, 1993 ; Sharma M. *et al.*, 2001 & 2004 ; Swiatecka-Urban A. *et al.*, 2005].

XI. ORGANISATION STRUCTURALE DE CFTR

Seule une structure cristallographique de CFTR à très basse résolution est connue (2 nm) [Rosenberg M.F. *et al.*, 2004]. Cependant, une topologie prédite a pu être déterminée à partir de la séquence primaire.

Ainsi, CFTR est composée de deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2), de deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD1 et NBD2) et d'un domaine de régulation (R) particulier à CFTR (**FIGURE I16A**) [Riordan J.R. *et al.*, 1989]. Les régions N- et C-

terminales sont situées dans le cytoplasme de la cellule. D'après le profil d'hydrophobicité, 80% des acides aminés de la protéine sont cytoplasmiques, 16% sont transmembranaires et 4% sont extracellulaires (**FIGURE I16B**) [Akabas M.H. *et al.*, 1997]. Ceci implique qu'au niveau cytoplasmique, de nombreuses interactions inter- mais aussi intramoléculaires doivent avoir lieu pour stabiliser la protéine. Au niveau du TMD2, sont présents deux sites de glycosylation, importants pour la maturation de la protéine [Riordan J.R. *et al.*, 1989].

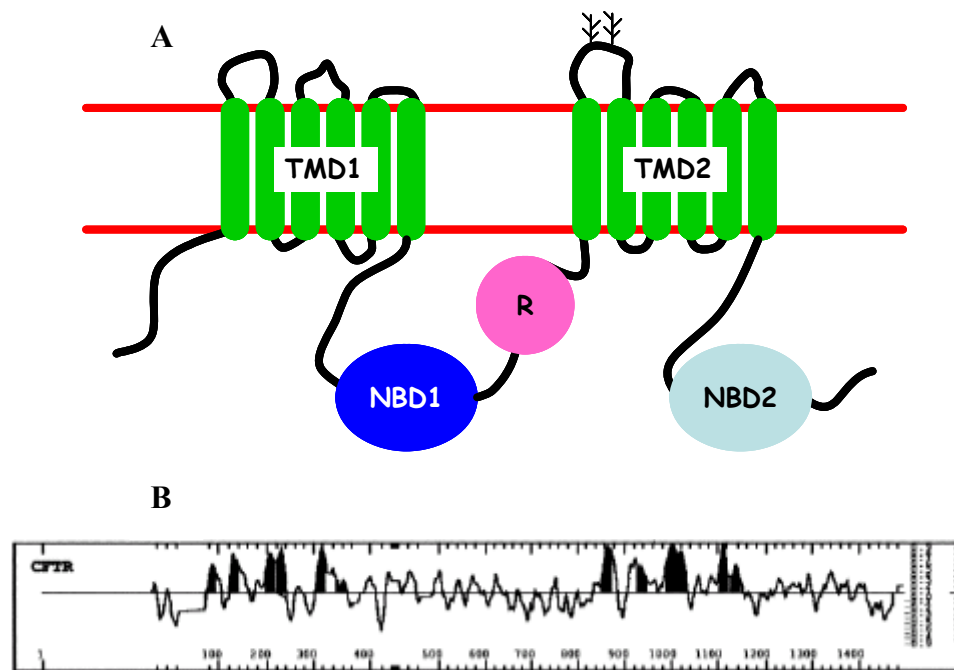


FIGURE I16: Structure prédite de la protéine CFTR (A) établie d'après son profil d'hydrophobicité (B). TMD: domaine transmembranaire, NBD: domaine de liaison aux nucléotides, R: domaine de régulation. Le profil d'hydrophobicité est adapté de Klein I. *et al.*, 1999.

A. LA PARTIE N-TERMINALE

La partie N-terminale de CFTR n'est pas encore bien étudiée malgré son importance pour l'expression et la régulation de CFTR. En effet, des protéines CFTR mutantes ($\Delta 2-79$, $\Delta 2-59$, $\Delta 35-45$ et $\Delta 60-72$) sont synthétisées correctement mais sont incapables de quitter le RE et d'atteindre la membrane plasmique [Prince L.S. *et al.*, 1999]. Les mêmes auteurs ont aussi montré que cette partie semble être suffisante pour l'endocytose de CFTR [Prince L.S. *et al.*, 1999].

La partie N-terminale de CFTR est aussi impliquée dans l'ouverture PKA-dépendant du canal Cl^- par une interaction avec le domaine R [Naren A.P. *et al.*, 1999]. De plus, l'équipe de Collawn a montré que la mutation de l'arginine en position 31 altère les processus de biogenèse et de maturation et augmente l'endocytose de la protéine lorsque celle-ci est capable d'atteindre la membrane plasmique [Jurkuvenaite A. *et al.*, 2005]. Il existe aussi des

clusters de résidus acides (D47, D44, D58, E51, E54, E60) pouvant être impliqués dans la régulation du canal [Chen J.-M. *et al.*, 2001].

Il est aussi relativement bien connu que cette partie de la protéine est capable d'interagir avec d'autres protéines impliquées dans la régulation de CFTR comme la syntaxin 1A (voir chapitre [III.B.4.i](#)).

B. LA PARTIE C-TERMINALE

En raison de l'absence de structure tridimensionnelle à haute résolution de CFTR, la limite entre les différents domaines de CFTR ne sont pas encore connues. Ainsi, la limite entre le domaine NBD2 et la partie C-terminale n'est qu'une prédiction obtenue à partir de la structure primaire de CFTR [Gentzsch M. *et al.*, 2002]. Cependant, il est maintenant admis que, sans être essentielle, cette partie est très importante pour la stabilité de la protéine. En effet, la délétion des 70 à 98 acides aminés terminaux de CFTR est responsable de l'instabilité membranaire et de la dégradation par le protéasome de CFTR, formant ainsi une classe de mutations à part entière [Haardt M. *et al.*, 1999 ; Benharouga M. *et al.*, 2001]. Cette partie est aussi impliquée dans la régulation indirecte d'autres protéines. La partie C-terminale de CFTR comprend trois régions impliquées dans la biogenèse et la maturation de la protéine :

- Un patch hydrophobique très conservé, appelé région I, formé par les résidus 1413 à 1416 (FLVI) responsable de la stabilité de la protéine mature [Gentzsch M. & Riordan J.R., 2001].
- Un deuxième patch appelé région II, formé par les résidus 1400 à 1404 impliqué quant à lui dans le maintien de la stabilité de la forme native de CFTR [Gentzsch M. & Riordan J.R., 2001].
- Une région III, modulatrice, formée des résidus 1390 à 1394 et responsable de la déstabilisation de la protéine [Gentzsch M. & Riordan J.R., 2001].

Il est ainsi remarquable d'observer que ces régions, bien qu'elles soient très proches, peuvent avoir des rôles bien différents. Il a aussi été démontré que la partie C-terminale de CFTR est porteuse d'une séquence d'endocytose de type YXXI, comprenant les acides aminés 1424 à 1427 (LYDSI) [Prince L.S. *et al.*, 1999 ; Peter K. *et al.*, 2002]. Ces résidus, en particulier la Y1424 et l'I1427, ont été montrés comme essentiels pour la stabilité de CFTR mature à la membrane plasmique, mais pas pour la biogenèse, la maturation ou la fonction de celui-ci. Très récemment, une étude a montré qu'il était possible d'augmenter le niveau de maturation de CFTR sauvage en mutant la leucine terminale en valine. Cet acide aminé placé

en position terminale peut en effet être reconnu comme un signal d'export du RE [Wendeler M.W. *et al.*, 2007]. Les interactions entre CFTR et d'autres protéines, dont les protéines NHERF et CAL, très importantes notamment pour la stabilité de la protéine mature à la membrane plasmique, ont été exposées précédemment (voir chapitre [III.B.4.ii](#)).

C. LES DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES

Comme la plupart des transporteurs ABC, CFTR possède deux domaines transmembranaires, chacun étant composé de six segments transmembranaires [Riordan J.R. *et al.*, 1989] organisés en hélices α . CFTR étant un canal ionique, il a été démontré que les TMDs contribuent à la formation du pore [Anderson M.P. *et al.*, 1991b]. Cependant, malgré un grand nombre d'études, ni le nombre de molécules de CFTR nécessaires pour former un pore, ni les segments de la protéine impliqués dans celui-ci ne sont connus. D'après la séquence des TMDs, il existe six acides aminés chargés positivement et conservés entre les espèces (K95, R134, R334, K335, R347, R1030) ([FIGURE I17](#)) [Riordan J.R. *et al.*, 1989]. La présence d'acides aminés chargés dans des segments transmembranaires est plutôt atypique et déstabilisante, et l'explication la plus raisonnable est que ceux-ci pourraient être impliqués dans le transport des ions chlorure. La sélectivité ionique de CFTR suit la séquence suivante: $\text{Br} \geq \text{Cl} \geq \text{I} \geq \text{F}^-$ [Anderson M.P. *et al.*, 1991b], et la mutation de deux des acides aminés chargés positivement peut modifier cette sélectivité au profit des ions I^- . Les travaux d'Akabas et de ses collaborateurs ont montré que le segment transmembranaire 6, appartenant au TMD1, et en particulier sa R352, pourrait être responsable de la sélectivité de CFTR [Akabas M.H. *et al.*, 1994 & 1997 ; Cheung M. & Akabas M.H., 1996]. De nombreuses études ont tenté de démontrer les relations entre les différents segments transmembranaires, mais sans grand succès. Toutefois, l'équipe de Clarke a montré, par des expériences de pontage chimique, une interaction entre les segments 6 et 12 nécessaire au transport ionique [Chen E.Y. *et al.*, 2004]. L'interaction entre TMD1 et TMD2, très importante pour la fonction, est quant à elle connue depuis longtemps, en particulier grâce à des expériences sur deux demi protéines CFTR, l'un comprenant TMD1, NBD1 et R, et l'autre TMD2 et NBD2, cotransfectées et pouvant reformer un canal fonctionnel grâce à l'interaction entre les TMDs [Ostedgaard L.S. *et al.*, 1997]. Il est aussi évident que les TMDs sont impliqués dans de nombreuses interactions avec les autres domaines de la protéine. Celles-ci seront décrites plus loin dans ce travail (voir [chapitre V.E.4](#)).

Introduction

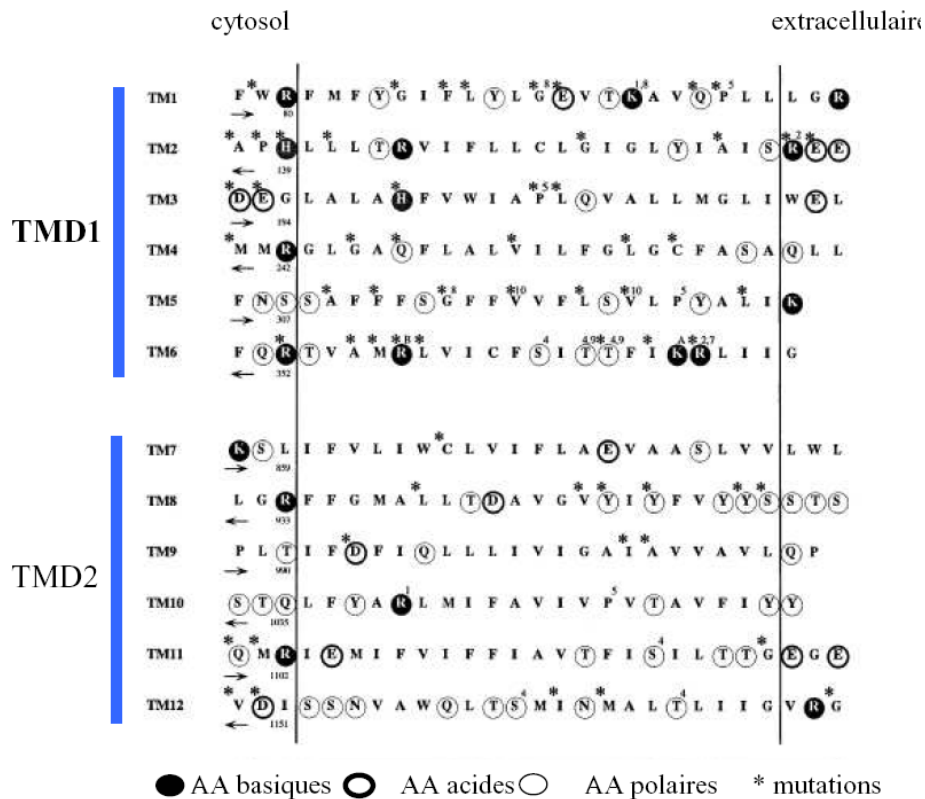


FIGURE I17: Alignement des séquences des segments transmembranaires de la protéine CFTR. Les acides aminés basiques sont surlignés en noir, les acides aminés acides sont entourés par de larges cercles noirs et les polaires par de fins cercles noirs. Les acides aminés qui lorsqu'ils sont mutés sont responsables de la mucoviscidose sont annotés par une étoile. D'après Dawson D.C. *et al.*, 1999.

Une particularité est aussi à noter pour le segment transmembranaire 6 (SM6). En effet, Tector et Hartl ont montré sur une demi protéine que ce segment est mobile et que pour que celui-ci soit maintenu dans la membrane plasmique, il faut qu'il interagisse avec d'autres parties de la protéine, probablement NBD1 et R. Si les interactions n'ont pas lieu, SM6 se retrouve dans le lumen du RE, ce qui pourrait contribuer à l'inefficacité générale de maturation de CFTR [Tector M. & Hartl F.U., 1999].

D. LE DOMAINE DE RÉGULATION R

Le domaine de régulation (R), est un domaine spécifique à la protéine CFTR. En effet, il n'est retrouvé dans aucun autre transporteur ABC. Ce domaine est appelé domaine de régulation car l'analyse de sa séquence primaire montre la présence de nombreux sites de phosphorylation par des protéines kinases, en particulier les protéines kinases A, C et G [Riordan J.R. *et al.*, 1989]. Ce domaine, qui ne possède pas de structure tertiaire propre [Ostedgaard L.S. *et al.*, 2000], joue un grand rôle dans le transport d'ions Cl^- , en permettant

l'ouverture du canal lorsqu'il est phosphorylé, en particulier par la protéine kinase A [Anderson M.P. *et al.*, 1991a ; Tabcharani J.A. *et al.*, 1991 ; Bear C.E. *et al.*, 1992 ; Chang X.B. *et al.*, 1993]. Ce domaine est en fait impliqué dans la coordination entre l'hydrolyse d'ATP et le *gating* du canal [Hwang T.-C. *et al.*, 1994]. La délétion du domaine R, contrairement à ce qui était attendu, entraîne un canal chlorure constamment ouvert en l'absence de phosphorylation [Rich D.P. *et al.*, 1991].

Le rôle de la PKA dans la régulation du transport des ions chlorures était bien établi avant la découverte de CFTR [Quinton P.M., 1983]. Des travaux ont montré en effet qu'une conductance chlorure peut être activée par la PKA dans des tissus sains, mais pas dans des tissus CF [Schoumacher R.A. *et al.*, 1987]. La PKA phosphoryle les sérines et les thréonine contenues dans des séquences spécifiques. Dix sites de reconnaissance à la PKA ont été retrouvés dans la séquence de CFTR, dont neuf dans le domaine R (**FIGURE I18**) [Riordan J.R. *et al.*, 1989]. Des études de mutagenèse dirigée, où toutes les sérines ont été remplacées par des alanines, ont montré que la suppression d'une seule sérine ne modifiait pas l'activité du canal, mais la suppression de plusieurs l'altérait [Seibert F.S. *et al.*, 1999]. De même, toutes les sérines de CFTR n'ont pas la même influence sur la fonction canal de CFTR. La mutation des dix sites de phosphorylation par la PKA ne supprime cependant pas l'activation de CFTR par la Forskoline mais la réduit fortement [Chang X.B. *et al.*, 1993].

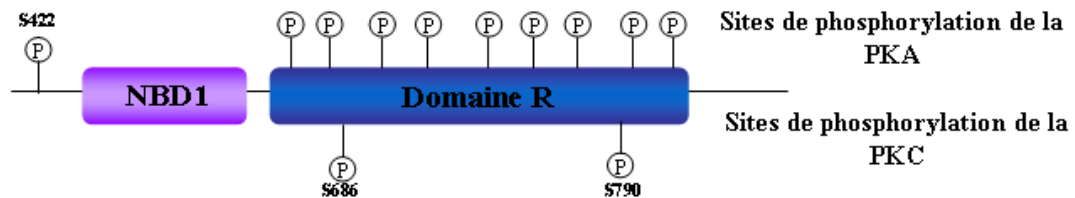


FIGURE I18 : Schéma représentant les différents sites de phosphorylation par les protéines kinases A (PKA) et C (PKC). P: site de phosphorylation, S: sérine. D'après Gadsby D.C. & Nairn A.C., 1999.

D'autres protéines kinases interviennent dans la régulation de CFTR, en particulier la protéine kinase C (PKC), décrite comme capable de potentialiser l'activation par la PKA (l'inverse est aussi vrai) [Tabcharani J.A. *et al.*, 1991 ; Berger H.A. *et al.*, 1993 ; Jia Y. *et al.*, 1997]. Des phosphatases, telle que PP2A, sont aussi très impliquées dans la régulation du canal [Berger H.A. *et al.*, 1993 ; Becq F. *et al.*, 1994].

Des études de dichroïsme circulaire réalisées par Dulhanty et Riordan en 1994 ont montré que la PKA phosphoryle un domaine R purifié. Un changement de conformation se produit alors, ce qui pourrait expliquer que le domaine R non phosphorylé ferme le pore du canal [Dulhanty A.M. & Riordan J.R., 1994]. Le domaine R interagirait avec le domaine NBD1 et

la phosphorylation changerait cette interaction, facilitant la fixation d'ATP et l'ouverture du canal [Ma J. *et al.*, 1997; Chappe V. *et al.*, 2005]. Récemment, Baker et collaborateurs, par des expériences de RMN (*Résonance Magnétique Nucléaire*) sur des domaines isolés, ont confirmé que la phosphorylation par la PKA entraînait une modification des sites du domaine R interagissant avec NBD1 (**FIGURE I19**). Ceci démontrant que la phosphorylation par PKA, en modifiant les interactions R-NBD1 est à l'origine de l'ouverture et de la fermeture du canal [Baker J.M.R. *et al.*, 2007]. Il a aussi été montré que la phosphorylation du domaine R par la PKA régule la dimérisation entre les deux NBDs de la protéine [Howell L.D. *et al.*, 2004] et l'activité canal grâce à des interactions avec la partie N-terminale de la protéine [Naren A.P. *et al.*, 1999].

Encore une fois, les interactions entre les domaines de CFTR sont très importantes. Les modifications par phosphorylation de l'interaction entre R et NBD1, voir entre R et la partie N-terminale, seraient à l'origine de l'ouverture et de la fermeture du canal [Naren A.P. *et al.*, 1999 ; Baker J.M.R. *et al.*, 2007].

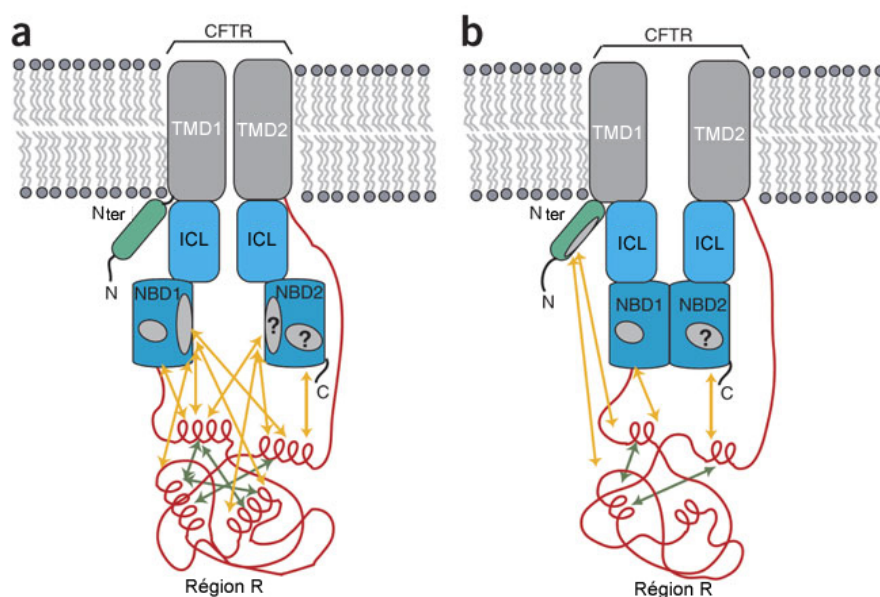


FIGURE I19 : Illustration schématique représentant comment la phosphorylation par la PKA induit des changements conformationnels du domaine R et des modifications des interactions interdomaines. D'après J.M.R. Baker *et al.*, 2007.

E. LES DOMAINES DE LIAISON AUX NUCLÉOTIDES

6. GÉNÉRALITÉS SUR LES NBDs

Les NBDs sont les éléments caractéristiques des transporteurs ABC. C'est en effet à partir de l'analyse de leurs séquences génique et protéique que chaque protéine peut être classée au sein de la superfamille des transporteurs ABC. Ces domaines comportent ainsi plusieurs

motifs très importants pour la fonction et qui sont donc très conservés. Les NBDs de CFTR, bien que n'ayant que 29 % de similarité, possèdent ces motifs [Riordan J.R. *et al.*, 1989]:

- les séquences de Walker A (GX₄GKS/T) et B (RX₆₋₈Φ₄D ou Φ représente un résidu hydrophobe) [Walker J.E. *et al.*, 1982]. Ces motifs sont impliqués dans la fixation d'ATP. La séquence A de Walker est aussi connue comme une boucle flexible riche en glycine appelée P-loop, impliquée dans l'ancrage de phosphate de l'ATP. Juste après la séquence B de Walker, il existe un résidu asparagine en position C-terminale (aussi appelée D-loop) très important pour la coordination du Mg²⁺.
- un court motif extrêmement conservé localisé juste avant la séquence B de Walker et appelé séquence C de Walker ou «signature ABC» (LSGGQ) [Hyde S.C. *et al.*, 1990]. Par comparaison avec les protéines G, les glutamines présentes dans ce motif sembleraient être impliquées dans la transition pentacovalente.
- une région possédant une glutamine très conservées et appelée Q-loop est impliquée dans la fixation du Mg²⁺ et l'attaque de l'eau [Moody *et al.*, 2002].
- La H-loop, est impliquée dans la formation de liaisons hydrogènes avec le γ-phosphate de l'ATP [Smith P.C. *et al.*, 2002; Campbell J.D. *et al.*, 2004].
- Une région critique pour la fixation d'ATP, contenant un acide aminé aromatique conservé et appelée A-loop [Ambudkar S.V. *et al.*, 2006].

2. LES NBDs DE CFTR

Les domaines de liaison aux nucléotides de CFTR possèdent toutes les caractéristiques des NBDs des transporteurs ABC. Ainsi on trouve les séquences de Walker A et B, la séquence signature des transporteurs ABC ainsi que les boucles Y, Q et D [Riordan J.R. *et al.*, 1989].

Ces domaines sont des sites de liaison et d'hydrolyse d'ATP impliqués dans la régulation du canal [Li C. *et al.*, 1996a]. Après phosphorylation du domaine R par les protéines kinases A et C, l'ATP peut alors se fixer sur les NBDs, être hydrolysé, et l'énergie ainsi produite permettre l'ouverture du canal [Anderson M.P. *et al.*, 1991c]. Comme certains membres de la sous-famille ABCC humaine, les NBDs de CFTR ne sont pas identiques et n'ont que 29% de similarité. Ils ne seraient donc pas impliqués de la même manière dans les processus d'ouverture et de fermeture du canal. En effet, NBD1 hydrolyse l'ATP très lentement de manière Mg²⁺-indépendante, et l'affinité est la même pour l'ATP et l'ADP, alors que NBD2

hydrolyse l'ATP très rapidement de manière Mg^{2+} -dépendante. La fixation de l'ATP sur NBD1 serait donc impliqué dans l'ouverture du canal alors que l'hydrolyse au niveau du NBD2 serait impliquée dans la fermeture du canal [Carson M.R. *et al.*, 1995 ; Aleksandrov L. *et al.*, 2001 & 2002 ; Berger A.L. *et al.*, 2005a ; Zhou Z. *et al.*, 2006]. Les différences de fonction entre les deux NBDs peuvent s'expliquer par les différences observées au niveau de la séquence primaire des domaines. Par exemple, une séquence signature ABC typique est LSGGQ. Or pour NBD2, cette séquence est LSHGH. De plus, l'histidine centrale de la boucle H, très importante pour la liaison avec le troisième phosphate de l'ATP, est remplacée par une sérine au niveau du NBD1, ce qui pourrait expliquer le faible taux d'hydrolyse d'ATP à ce niveau [Riordan J.R. *et al.*, 1989].

Récemment, des travaux ont permis de résoudre les structures à haute résolution des NBD1 de CFTR murin et humain (**FIGURE 120**) [Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005]. Il a alors été constaté que le domaine NBD1 de CFTR possède une structure tertiaire centrale similaire à celle des NBDs des autres ABC [Lewis H.A. *et al.*, 2004], mis à part deux éléments structuraux. Il existe en effet au niveau de NBD1 de CFTR une insertion d'environ 30 acides aminés située entre les résidus 404 et 435, entre les brins 1 et 2 du domaine β anti-parallèle (S1 et S2 de la **FIGURE 120**) ainsi qu'une extension d'une trentaine d'acides aminés située entre les résidus 639 et 670, entre les hélices α 9 et 9b [Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005]. Ces régions, contenant des sérines phosphorylables, sont dites «régulatrices». Cependant, aucune de ces régions ne semble essentielle pour la régulation PKA- et ATP-dépendante. De plus, il y'a de fortes chances que l'extension carboxyterminale de NBD1 appartienne en réalité au domaine R [Csanády L. *et al.*, 2005]. Ces études structurales prouvent aussi que la F508, entre les séquences de Walker A et B de NBD1, n'est pas située dans la partie catalytique, mais à la surface du domaine, semblant être impliquée dans les interactions interdomaines de la protéine, comme l'avaient prédit la structure de l'ABC bactérien BtuCD [Locher K.P. *et al.*, 2002 ; Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005]. A ce jour, il n'existe pas encore de structure de NBD2 de CFTR, mais la séquence est globalement comparable à celle des autres ABC.

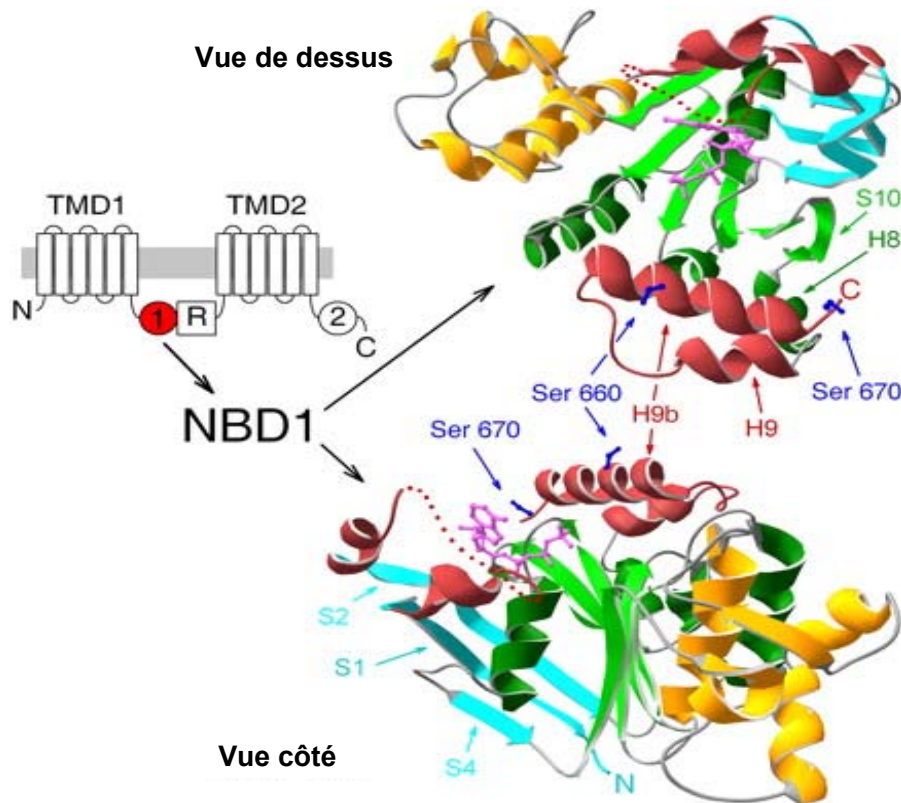


FIGURE I20: Diagrammes en ruban de la structure de NBD1 de CFTR murin avec du MgATP fixé, dans deux orientations : en haut, vue de côté de la poche de fixation de l'ATP et en bas vue perpendiculaire au sommet le long du plan du feuillet β parallèle F1-like. Code couleur: feuillet β anti-parallèle N-terminal spécifique des ABC en cyan; noyau de la poche de fixation à l'ATP F1-like en vert; domaine en hélice α ABC spécifique en jaune; insertion et extension non-conservées en rouge; ATP en magenta; chaînes latérales des sérines 660 et 670 en bleu. La ligne brisée rouge dans l'insertion non conservée représente les résidus désordonnés 412-428, non conservés dans la structure et qui indique simplement la continuité de la chaîne polypeptidique. D'après Csanády L. *et al.*, 2005.

3. LE COUPLAGE FONCTIONNEL NBD1-NBD2

NBD1 et NBD2 peuvent fonctionner de manière indépendante [Ko Y.H. & Pedersen P.L., 1995 ; Devidas S. *et al.*, 1998 ; Yue H. *et al.*, 2000], mais il existe cependant un couplage fonctionnel. Les NBDs doivent en effet interagir pour obtenir l'activité catalytique optimale [Kidd J.F. *et al.*, 2004]. En effet, comme pour les autres membres de la superfamille des transporteurs ABC, l'organisation catalytique des NBDs de CFTR est semblable à celle de l'ATPase F1 [Higgins C.F., 1992].

Les feuillets β recouvrent le site de liaison aux nucléotides et contiennent des acides aminés aromatiques permettant la liaison à l'ATP (**FIGURE I21**). Le sous-domaine composé par les hélices α , incluant la séquence signature, joue un rôle dans la transduction intramoléculaire du signal tout en médiant l'interaction avec les TMDs. L'hétérodimère formé par les NBDs, arrangés tête-bêche, permet ainsi le maintien de l'ATP entre les deux sous

unités. Chaque site de liaison est composé du Walker A, du Walker B et de la boucle Q d'une sous-unité et de la séquence signature des ABC de l'autre sous-unité (**FIGURE I21**) [Lewis H.A. *et al.*, 2004 ; Eudes R. *et al.*, 2005]. Un tel arrangement est en accord avec le modèle de liaison à l'ATP des transporteurs ABC dans lequel la liaison et l'hydrolyse de l'ATP induisent respectivement la formation et la dissociation de l'hétérodimère formé par les NBDs [Vergani P. *et al.*, 2005a & b], provoquant ainsi un changement conformationnel du TMD1 *via* son interaction avec le NBD1 [Lewis H.A. *et al.*, 2004]. En produisant des protéines CFTR humaines chimériques possédant des NBDs murins, une étude récente a aussi montré que la fixation d'ATP entraîne tout d'abord un changement de conformation de NBD1 puis de NBD2, prouvant ainsi que la dimérisation entre les deux NBDs est un phénomène asymétrique «dirigé» par NBD1 [Scott-Ward T.S. *et al.*, 2007]. Il reste cependant à expliquer comment se transmet le signal amenant au changement de conformation. Récemment, il a été montré que l'hétérodimérisation NBD1-NBD2 est promue par la phosphorylation du domaine R par la PKA [Mense M. *et al.*, 2006].

Les nouvelles données structurales montrent qu'il existe deux sites de fixation et d'hydrolyse d'ATP, appelés A et B, indépendants des NBDs originels. Il persiste cependant une asymétrie entre les deux sites, nécessaire à une activité catalytique maximale. Contrairement au site B, constitué en partie par le NBD2 et correspondant au site canonique de l'hydrolyse de l'ATP, le site A, constitué en grande partie par le NBD1, n'est pas constitué de tous les acides aminés nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP, et son activité enzymatique est donc très faible (**FIGURE I20**). Il a ainsi été récemment rapporté que la séquence de Walker B de NBD2, appartenant au site B, joue un rôle primordial dans l'activité ATPase de CFTR via l'hétérodimère NBD1-NBD2 [Stratford F.L.L. *et al.*, 2007].

Il a aussi été reporté l'existence d'une activité adénylate kinase pour les NBDs de CFTR, en particulier NBD2. Cette activité, liée à l'homodimerisation, semble impliquée dans la régulation de l'activité canal de CFTR [Randak C. *et al.*, 1997 ; Randak C. & Welsh M.J., 2003 & 2007 ; Gross C.H. *et al.*, 2006]. Toutefois, il a été avancé que cette activité adénylate kinase était principalement due à la formation d'un dimère non-physiologique entre des NBDs purifiés *in vitro*. L'activité majoritaire d'une protéine CFTR entière reste donc l'activité ATPase (Ramjeesingh M. *et al.*, 2008).

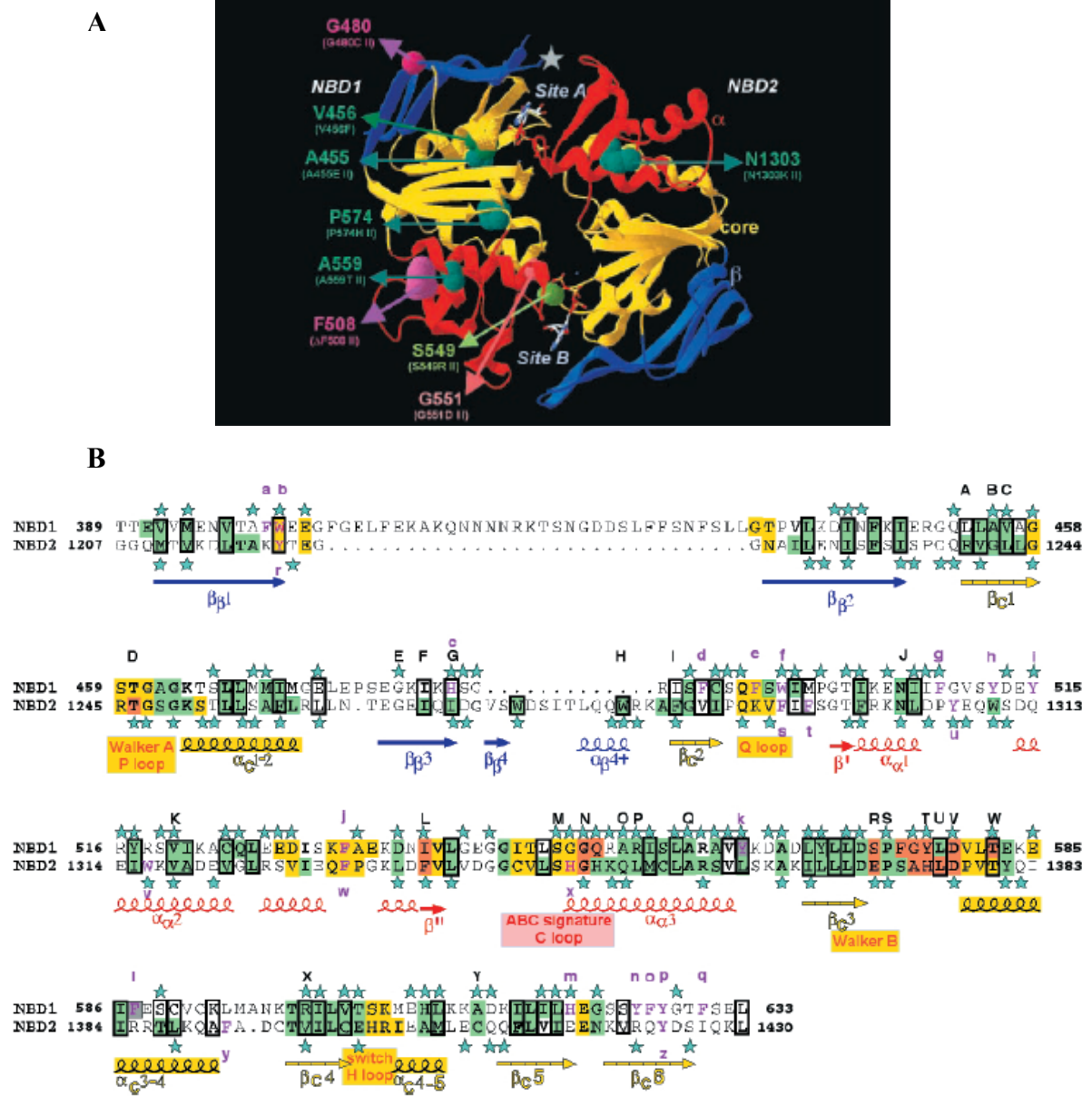


FIGURE 121: Schéma représentant l'hétérodimère fonctionnel NBD1-NBD2 de CFTR (A), établi à partir de l'alignement des séquences de ces domaines (B). Les structures secondaires caractéristiques sont annotées sous l'alignement. D'après Eudes R. *et al.*, 2005.

4. RÔLE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DE LA F508

La phénylalanine en position 508 de CFTR, située au niveau du NBD1, est très importante pour l'adressage correct de la protéine. En effet, la délétion de ce seul acide aminé est responsable de la majorité des cas de mucoviscidose [Kerem B.-S. *et al.*, 1989].

De nombreuses études laissent penser que cet acide aminé est au centre d'une région impliquée dans les interactions entre NBD1 et les TMDs de CFTR, et la perte de cette F508 romprait ces interactions [Du K. *et al.*, 2005]. D'abord, d'après la structure des NBD1 murin et humain de CFTR, la F508 est située à l'extérieur de la poche catalytique, à la surface du

domaine [Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005], comme cela avait par ailleurs été prédit par modélisation [Eudes R. *et al.*, 2005]. De plus, l'acide aminé correspondant à la F508 dans les ABC bactériens de structures connues est situé dans la région d'interaction entre NBD1 et les TMDs, et cette interaction se fait probablement par l'intermédiaire des boucles intracellulaires des TMDs [Locher K.P. *et al.*, 2002 ; Dawson R.J.P. & Locher K.P., 2006]. Enfin, il est très important de comprendre que ce n'est pas le squelette de l'acide aminé qui est très important pour CFTR, mais sa chaîne latérale, puisque lorsque la F508 est substituée par chacun des 19 autres acides aminés, le repliement et la maturation de la protéine sont dans presque tous les cas altérés (la seule exception est F508C) [Du K. *et al.*, 2005 ; Thibodeau P.H. *et al.*, 2005]. Une étude récente a aussi montré l'importance de la chaîne latérale de la F508 dans la durée de l'intervalle où le canal est fermé [Cui L. *et al.*, 2006].

5. INTERACTIONS INTERDOMAINES ET MATURATION

Le repliement, la maturation et le trafic de la protéine CFTR sont des phénomènes extrêmement complexes. Cette complexité provient sans doute de la synthèse séquentielle de segments hydrophiles et hydrophobes avec le repliement des domaines hydrophiles entrecoupé de l'insertion dans la membrane des domaines hydrophobes. Pour quitter le RE, CFTR doit atteindre un niveau de conformation adéquat pour passer l'ERQC. Le processus de repliement menant à ce niveau de conformation reste encore très mal connu. Du et collaborateurs ont montré que le repliement correct de NBD2 nécessite des interactions avec un domaine NBD1 intact par l'intermédiaire d'une région comprenant la chaîne latérale de la F508 [Du K. *et al.*, 2005]. Les auteurs en ont donc déduit que le repliement de cette protéine se faisait à la fois de manière co- et post-traductionnelle. NBD1 se repliant individuellement de manière co-traductionnelle puis facilitant le repliement de NBD2 de manière post-traductionnelle. NBD2 représenterait alors le facteur limitant du repliement global de la protéine et la délétion de la F508 bloquerait ce repliement post-traductionnel. Pour Thibodeau et collaborateurs, il existerait en fait un processus de repliement différent, présentée comme une sorte de séquence hiérarchique de repliement. NBD1 se replierait de manière co-traductionnelle, puis au fur et à mesure que la chaîne polypeptidique est synthétisée, des interactions se produisent. D'abord entre NBD1 et TMD1, puis entre TMD1 et TMD2 et enfin entre NBD2 et TMD2 (**FIGURE 122**) [Thibodeau P.H. *et al.*, 2005]. Plus récemment, une étude basée sur des expériences de traduction *in vitro* et de protéolyses ménagées a montré que CFTR était principalement replié de manière co-traductionnelle, montrant ainsi que le repliement de chaque domaine se produit souvent indépendamment des autres. Cette étude

confirme en fait l'étude de Thibodeau et collaborateurs et la précise : chaque domaine se replie majoritairement co-traductionnellement puis ceux-ci interagissent entre eux de manière post-traductionnelle pour obtenir la conformation finale de la protéine (**FIGURE 122**) [Kleizen B. *et al.*, 2005]. Cependant, l'équipe de Riordan, en étudiant des protéines CFTR tronquées de leurs domaine NBD2 et C-terminal, a démontré que malgré la capacité de chaque domaine à atteindre un certain niveau de repliement individuellement, les interactions post-traductionnelles entre ces domaines semblent être très importantes [Cui L. *et al.*, 2007].

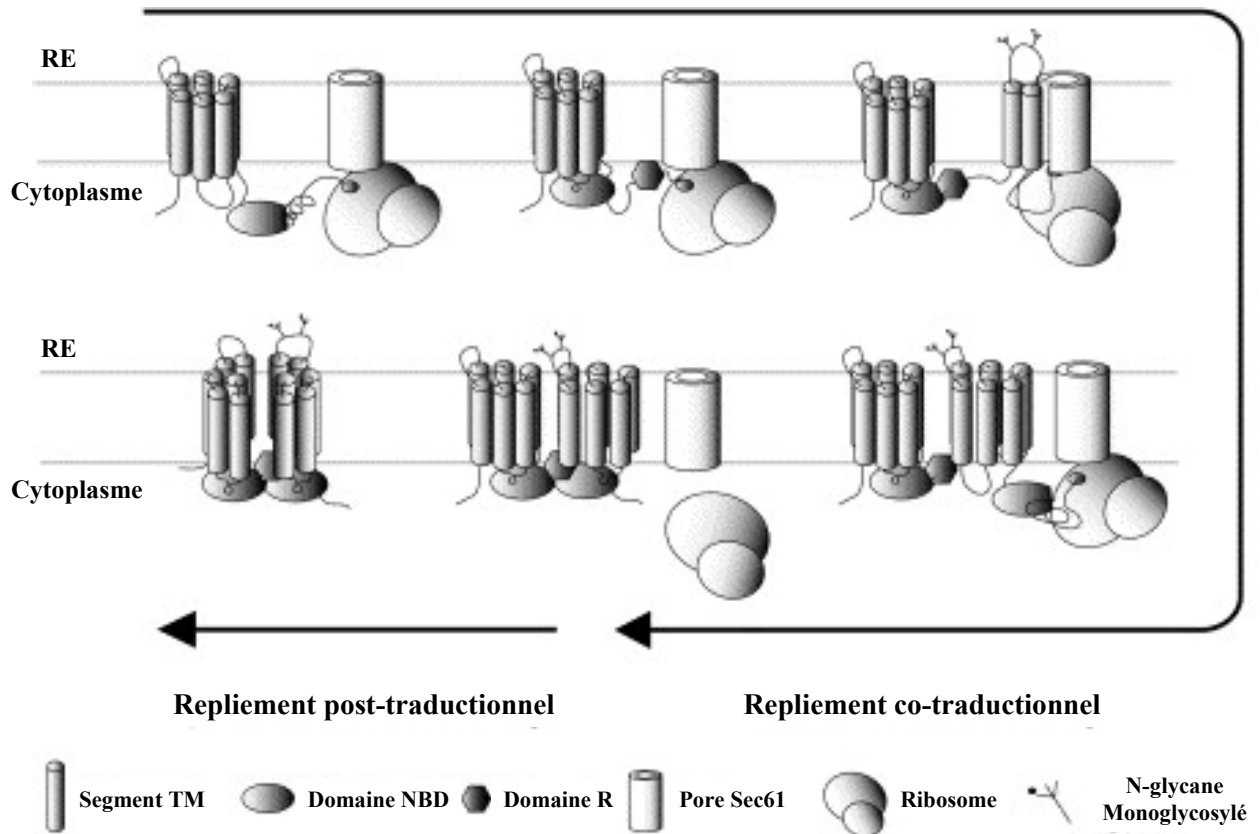


FIGURE 122: Modèle du repliement séquentiel co- et post-traductionnel de la protéine CFTR. D'après Kleizen B. *et al.*, 2006.

XII. LA MUTATION F508del: UN DEFECT DE REPLIEMENT

A. REPLIEMENT DES PROTÉINES TRANSMEMBRANAIRES

Les protéines transmembranaires intégrales sont pour la grande majorité impliquées dans des processus vitaux pour la cellule. Ces protéines sont constituées d'une succession de domaines hydrophiles et hydrophobes et leur processus de repliement est très complexe. En effet, le repliement local de chaque domaine est entrecoupé de l'insertion de segments dans la membrane lipidique. Il est reconnu que comme pour les protéines solubles, la séquence

Introduction

primaire des protéines CFTR contient toutes les informations nécessaires pour atteindre sa structure finale [London E. & Khorana H.G., 1982]. Mais à ce jour et malgré tous les efforts réalisés par la communauté scientifique, les mécanismes par lesquels de telles protéines atteignent leur structure tridimensionnelle finale dans la membrane plasmique reste encore largement inconnus.

Il existe deux principaux types de structures traversant les membranes lipidiques. Les hélices α et les tonneaux β , mais ce sont les hélices α qui dominent dans les récepteurs et les canaux. Un modèle de repliement en deux étapes de ces hélices α a été proposé. D'abord, les hélices α individuelles stables sont formées, puis ces hélices s'assemblent pour former une protéine fonctionnelle [Popot J.L. & Engelman D.M., 1990]. Cependant, il semblerait que ce modèle ne s'applique qu'aux protéines les plus simples, et que le repliement des protéines polytopiques soit beaucoup plus complexe.

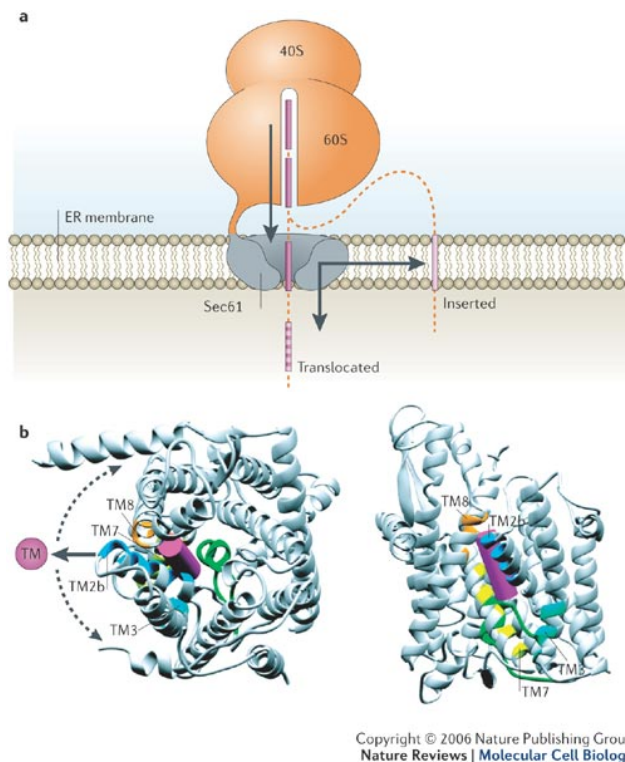


FIGURE I23 : Schéma représentant la reconnaissance d'une hélice α par le translocon. L'hélice est représentée en violet, le ribosome en orange et le translocon (Sec61) en bleu. Les flèches partant du translocon montrent les deux ouvertures de celui-ci : une vers le cytoplasme et une vers la membrane. D'après Von Heijne G., 2006.

Le moyen par lequel ces éléments structuraux sont intégrés dans les membranes reste encore flou. Cependant, il semblerait que dans les cellules eucaryotes, la majorité des peptides destinés à devenir des protéines transmembranaires soient tout d'abord incorporés dans la membrane du RE de manière co-translationnelle. Le repliement et l'incorporation à la

membrane de ces protéines de manière co-traductionnelle nécessitent la formation d'un complexe entre le ribosome et les protéines du translocon du RE. Chez les mammifères, le translocon du RE est constitué du complexe hétérotrimérique Sec61 (Sec61 $\alpha\beta\gamma$) formant un canal, ainsi que de nombreuses autres protéines associées, comme SRP (*Signal Recognition Particle*), SR (*SRP Receptor*) ou BiP, impliqué dans la fermeture [Hamman B.D. *et al.*, 1997 ; Mothes W. *et al.*, 1997]. Le mécanisme d'intégration à la membrane par le translocon est encore une fois très mal connu, mais il semblerait que celui-ci possède deux ouvertures (**FIGURE 123**). La première vers le cytoplasme, permettant ainsi la sécrétion de protéine et/ou la translocation des domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires, et la seconde, perpendiculaire au canal à proprement parlé et dirigé vers la bicouche lipidique, facilitant ainsi cette intégration [Rapoport T.A. *et al.*, 2004]. Pour des protéines transmembranaires multidomaines, il existe une difficulté supplémentaire : les épisodes d'intégration à la membrane par le translocon sont entrecoupés par des épisodes de repliement classique des domaines cytosoliques, impliquant un machinerie protéique complexe avec de nombreuses protéines chaperonnes, très coûteuse en énergie pour la cellule. Chaque futur segment transmembranaire possède en fait un signal N-terminal de début d'intégration ainsi qu'un signal C-terminal de fin d'intégration. Ces signaux restent encore très peu connus, et il apparaîtrait qu'ils ne soient pas suffisants pour déterminer à eux seuls cette intégration. Il semblerait en effet que des interactions entre ces segments et leurs régions flanquantes, de manière post-traductionnelle, aient un grand rôle à jouer [Lu Y. *et al.*, 1998].

Une fois intégrées dans la membrane lipidique, les hélices α vont interagir entre elles et s'assembler pour atteindre un niveau énergétique favorable nécessaire pour donner à la protéine sa conformation native, stable [Mothes W. *et al.*, 1997]. Par exemple, pour un canal ionique, cette étape pourrait correspondre à la formation du pore. Par la suite, les protéines transmembranaires intégrées dans la membrane du RE vont être transportées vers la membrane plasmique par transport vésiculaire.

B. REPLIEMENT DE LA PROTÉINE CFTR

CFTR est une protéine transmembranaire intégrale multidomaine, et son processus de repliement et d'intégration à la membrane lipidique s'avère extrêmement complexe. Les études réalisées montrent pour la plupart que chaque domaine de la protéine se replie majoritairement de manière co-traductionnelle grâce à l'aide de nombreuses chaperonnes [Kleizen B. *et al.*, 2005]. Par la suite, ceux-ci interagissent entre eux de manière post-

traductionnelle pour donner à CFTR sa conformation native, stable énergétiquement [Du K. *et al.*, 2005 ; Thibodeau P.H. *et al.*, 2005 ; Cui L. *et al.*, 2007].

L'intégration à la membrane lipidique des segments transmembranaires de CFTR a aussi été étudiée. L'étude réalisée par l'équipe de Thomas sur des peptides correspondant aux segments transmembranaires de TMD1 a montré : (i) que chacun de ces segment, conformément à la théorie de repliement des protéines transmembranaires en deux étapes [Popot J.-L. & Engelman D.M., 1990], se structurent et intègrent la membrane plasmique, et (ii) les segments transmembranaires 2 et 6 (S2 et S6) ont un comportement particulier [Wigley W.C. *et al.*, 1998]. En effet, probablement à cause de la présence d'acides aminés chargés, ces segments semblent avoir une structure différente (hélice α ou tonneau β) en fonction de l'environnement dans lequel ils sont. Les auteurs montrent ainsi l'importance pour leur intégration à la membrane des interactions qu'ont ces segments avec leurs régions flanquantes et ces observations ont par la suite été confirmés par l'étude réalisée par Tector et Hartl (Tector M. & Hartl F.U., 1999). *In vitro*, l'implication du translocon pour l'intégration à la membrane lipidique des segments transmembranaires est déjà connue [Sadlish H. & Skach W.R., 2004]. La coopération entre les différentes régions de la protéine pour le repliement et la translocation des segments hydrophobes dans la membrane plasmique a aussi été démontrée par l'équipe de Skach. En effet, cette équipe a montré que la translocation de la protéine CFTR se faisait à la fois par des mécanismes co- et post-traductionnels, TMD2 pouvant aider à la translocation de TMD1 [Lu Y. *et al.*, 1998].

C. MUTATION F508del ET REPLIEMENT

Il est connu depuis longtemps que la mutation F508del empêche la maturation de CFTR en altérant son repliement [Denning G.M. *et al.*, 1992a ; Thomas P.J. *et al.*, 1992b ; Thomas P.J. & Pedersen P.L., 1993]. Cependant, le processus par lequel la délétion d'un seul acide aminé sur 1480 altère le repliement d'une protéine multidomaine entière est relativement mal compris. La première question que la communauté scientifique s'est posée était de savoir si la mutation F508del entraînait une altération du processus de repliement ou un défaut de stabilité de la forme native de CFTR. Pour répondre à cela, plusieurs études ont alors été réalisées. La première, réalisée *in vitro*, portait sur de petits peptides de 66 ou 67 acides aminés englobant les régions de fixation et d'hydrolyse d'ATP prédites de NBD1 (sauf la séquence de Walker B) et la région de la F508 de NBD1 [Thomas P.J. *et al.*, 1991 & 1992a]. L'équipe de Pedersen a montré par dichroïsme circulaire que la délétion de la F508 entraînait

une altération de la structure en feuillet β initialement prédominante dans le peptide (**FIGURE I24**) [Thomas P.J. *et al.*, 1992a]. Ces résultats, ont par la suite été confirmés par une étude de repliement *in vitro* de domaines NBD1 entiers mutés ou non [Qu B.-H. & Thomas P.J., 1996]. Il a ainsi été montré que la mutation F508del imposait un blocage cinétique à un niveau intermédiaire de repliement de CFTR [Qu B.-H. *et al.*, 1997]. De l'ensemble de ces données, les auteurs ont déduit que malgré les difficultés à extrapoler les résultats obtenus sur des «bouts» de protéines à une protéine entière, la délétion de la F508 entraînait un mauvais repliement local de NBD1 qui serait à son tour responsable d'un mauvais repliement global de CFTR. Cette anomalie entraînerait alors la séquestration puis la dégradation de la protéine au niveau du RE. Cette hypothèse a par la suite été confirmée *in vivo* par des expériences de protéolyse ménagée, montrant que CFTR-F508del est globalement mal repliée, ou plutôt bloquée sous la forme d'un intermédiaire de repliement incapable de passer une barrière cinétique [Zhang F. *et al.*, 1998].

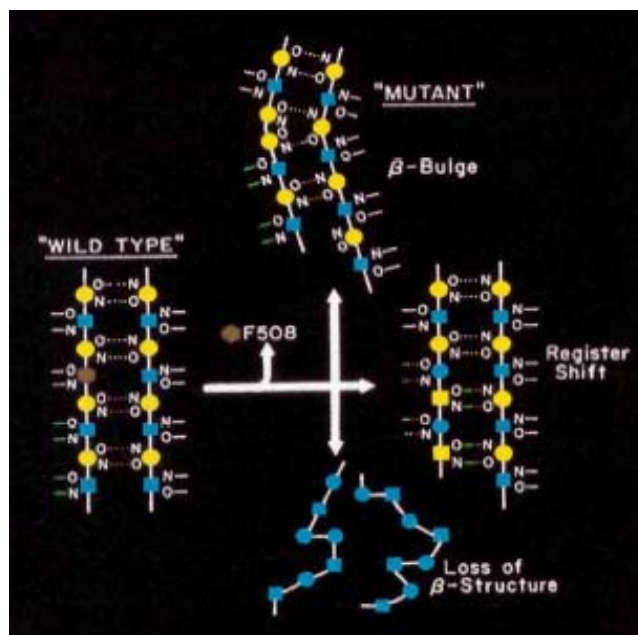


Figure I24: Étude par dichroïsme circulaire des effets de la mutation F508del sur la structure locale en feuillet β d'un peptide correspondant à une partie de NBD1 (sans Walker B). D'après Thomas P.J. *et al.*, 1992a.

Comme nous l'avons abordé précédemment, les structures tridimensionnelles de NBD1 humain sauvage et muté F508del sont maintenant disponibles [Lewis H.A. *et al.*, 2005]. Celles-ci ont montré que contrairement à ce qui avait été admis, la mutation F508del n'entraînait pas d'altération de repliement du domaine NBD1, hormis à proximité de la phénylalanine (**FIGURE I25**).

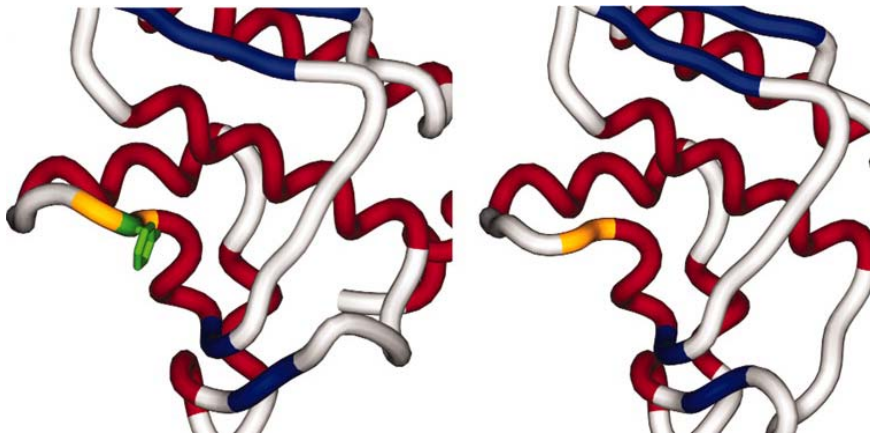


FIGURE I25: Structure locale de la région de la phénylalanine 508 de CFTR en présence (gauche) ou en l'absence (droite) de cet acide aminé. La conformation globale du domaine reste inchangée. D'après Lewis H.A. *et al.*, 2005.

De façon plus surprenante, l'équipe de Lukacs, par des expériences de protéolyse ménagée, a montré que la mutation F508del n'entraînait pas le mauvais repliement du NBD1 mais plutôt de la partie carboxy-terminale de CFTR, incluant le NBD2 [Du K. *et al.*, 2005]. De plus, la substitution de la F508 par n'importe quel autre acide aminé montre que ce n'est pas le squelette de la phénylalanine qui est important pour l'obtention de la conformation correcte de la protéine, mais sa chaîne latérale [Du K. *et al.*, 2005 ; Thibodeau P.H. *et al.*, 2005]. Ceci confirme que le défaut de repliement de la protéine CFTR-F508del n'est pas dû à une déstabilisation locale d'une zone appartenant au NBD1, mais à un défaut d'interactions entre NBD1 et les autres domaines. La chaîne latérale de la F508 apparaît en fait comme le point central de ces interactions, en particulier entre NBD1 et les TMDs. Les mêmes conclusions ont été dégagées à partir de l'étude des structures des transporteurs ABC bactériens entiers BtuCD et Sav1866 [Locher K.P. *et al.*, 2002 ; Dawson R.J.P. & Locher K.P., 2006] et à partir de la structure NBD1 de CFTR [Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005 ; Cyr D.M., 2005]. L'hypothèse de la rupture d'interaction entre NBD1 et les TMDs comme facteur majeur du défaut induit par la délétion de la F508 semble donc être la plus plausible.

Objectifs

Objectifs

Au vu de l'ensemble des données moléculaires, biochimiques, cellulaires et structurales disponibles aujourd'hui pour les protéines multidomaines, particulièrement les protéines de la superfamille des transporteurs ABC comme CFTR, il ressort que les interactions interdomaines sont très importantes pour leur comportement cellulaire normale.

Pour CFTR, les interactions entre les domaines NBD1, NBD2, TMD1 et TMD2, directement ou par l'intermédiaire de protéines cytoplasmiques, constituent l'étape limitante non seulement pour le processus de repliement mais aussi pour le trafic intracellulaire, la fonction, la régulation et la dégradation.

A ce jour, l'ensemble des études visant à déterminer les rôles de ces domaines a été réalisé soit *in vitro* sur des fragments isolés, soit *in vivo* sur des protéines CFTR mutées ou tronquées.

Cependant, aucune étude n'a intégré le rôle de chaque domaine dans une protéine CFTR entière.

Ainsi, pour essayer de comprendre *in vivo* l'importance de chaque domaine (NBD1, NBD2, TMD1 et TMD2), nous avons choisi de travailler avec des protéines CFTR entières mais dans lesquelles les domaines ont été supprimés, permutés, ou remplacés.

Pour cela, mon travail de thèse s'est déroulé en deux parties.

La première a porté sur l'implication des domaines NBD1 et NBD2 dans les processus de :

- biosynthèse
- repliement
- maturation
- adressage
- fonction
- stabilité membranaire de CFTR

La deuxième partie a traité d'une manière préliminaire les rôles des segments transmembranaires S6 et S12, appartenant respectivement aux domaines TMD1 et TMD2, dans la biosynthèse, la maturation et l'orientation de CFTR par rapport à la bicouche lipidique.

L'étude des rôles des différents domaines ainsi que de leurs interactions dans le comportement de CFTR est primordiale pour la compréhension des relations structure/fonction nécessaires au développement de manière plus spécifique de molécules capables de corriger les défauts de repliement causés par des mutations du gène *cftr* comme F508del.

Matériels & Méthodes

I. **BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Pour étudier le(s) rôle(s) des domaines NBDs ainsi que des segments transmembranaires S6 et S12, appartenant respectivement à TMD1 et TMD2 de la protéine CFTR, nous avons utilisé la technique de Splicing by Overlap Extension (SOE) par PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

A. **SPLICING BY OVERLAP EXTENSION PAR PCR**

2. **PRINCIPE**

La PCR permet d'amplifier un fragment d'acide nucléique d'intérêt. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en oeuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre, et bornent ainsi le fragment amplifié. L'idée consiste en l'utilisation des produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes, permettant une amplification exponentielle. Imaginée par K. Mullis en 1985 [Mullis K. *et al.*, 1986] et récompensée par le prix Nobel en 1993, la technique connaît un essor considérable grâce à la découverte d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase), permettant ainsi une automatisation de la technique.

2. **SPLICING BY OVERLAP EXTENSION**

Les différentes protéines CFTR modifiées ont été obtenues par la technique de «Splicing by Overlap Extension» (SOE). Cette méthode d'«épissage par extension d'amorces hybrides» est basée sur la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) et permet la recombinaison de fragments d'ADN de manière précise et spécifique. Développée dans les années 90 [Horton R.M. *et al.*, 1989; Warrens A.N. *et al.*, 1997], la méthode de SOE possède deux avantages majeurs. Premièrement, elle permet, par l'amplification résultante des étapes de PCR, l'obtention d'une grande quantité d'ADN disponible pour le clonage. Deuxièmement et principalement, elle permet l'épissage précis de la séquence nucléotidique d'intérêt, sans transporter de matériel supplémentaire ni modifier le reste du gène. Cette méthode avait déjà été appliquée sur des transporteurs ABC, pour obtenir des protéines recombinantes SUR1-SUR2A [D'Hahan N. *et al.*, 1999; Moreau C. *et al.*, 2000].

Le principe de la SOE est décrit dans la **FIGURE M1**. La méthode nécessite l'utilisation d'oligonucléotides classiques mais aussi d'oligonucléotides hybrides possédant une région 5' complémentaire d'une partie du gène et une partie 3' complémentaire d'une autre, le tout

servant à la jonction des fragments recombinants. Toutes les réactions ont été réalisées sur le plasmide pcDNA3.1 contenant *CFTR*. La SOE se compose en fait de plusieurs étapes. La première est composée de trois réactions PCR :

- la première réaction vise à amplifier la partie située juste avant NBD2, avec la partie 3' du fragment obtenu complémentaire à la région 5' de NBD1
- la deuxième réaction vise à amplifier le domaine NBD1, avec les extrémités du fragment obtenu complémentaires des parties situées avant et après NBD2.
- la troisième réaction vise à amplifier la partie située juste après NBD2, avec la région 5' du fragment obtenu complémentaire à la région 5' de NBD1.

Après purification, ces trois fragments PCR ont été regroupés dans un même tube et ont été soumis à une deuxième étape: une réaction PCR avec la particularité que chacun des trois fragments a servi d'oligonucléotide pour l'amplification des autres. Le fragment unique ainsi obtenu est alors digéré par les enzymes de restriction, *ApaI* et *Eco72I* (*Fermentas*, France), dont les sites de coupure sont déjà présents dans le gène *CFTR* d'origine. Les mêmes enzymes ont été utilisées pour digérer le plasmide pcDNA3.1-*CFTR*. Le fragment PCR et le plasmide, digérés, ont par la suite été ligués et le plasmide généré a été transformé dans des cellules compétentes. Les plasmides obtenus ont ensuite été purifiés et les constructions ont été vérifiées par digestions enzymatiques et par séquençage.

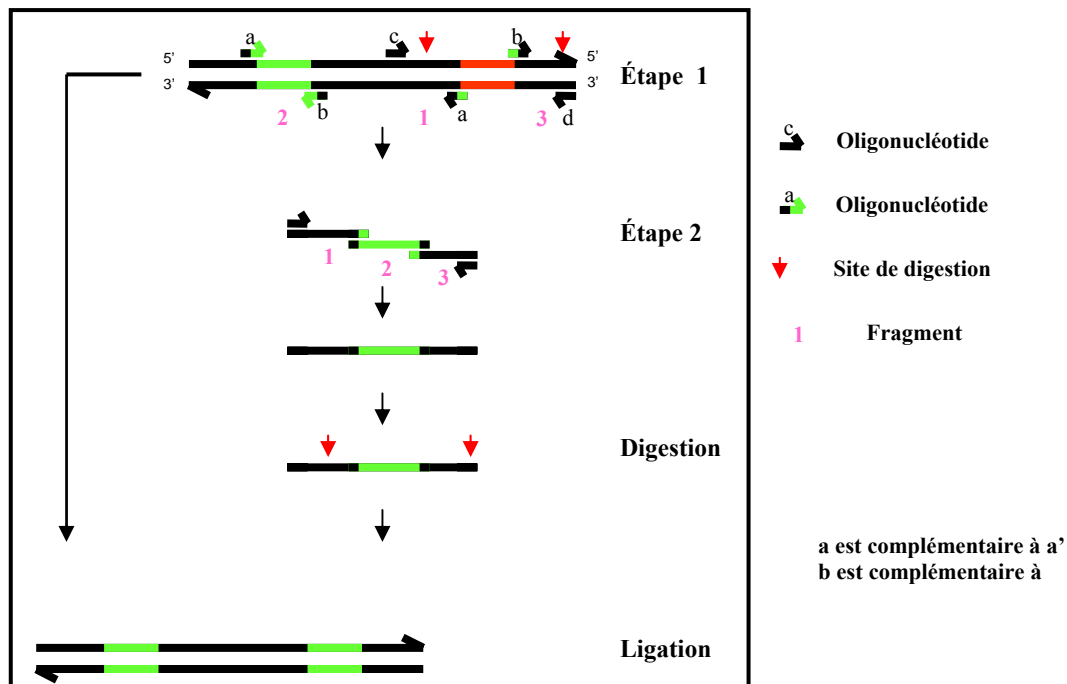


FIGURE M1: Schéma représentant la technique de SOE. NBD1 est représenté en vert et NBD2 en rouge.

Les oligonucléotides utilisés pour créer les gènes codant pour les protéines CFTR modifiées possédant des NBDs inversés, déplacés ou supprimés sont présentés dans le **TABLEAU M1**, et ceux utilisés pour créer des protéines CFTR dans lesquelles les segments transmembranaires S6 et/ou S12 ont été supprimés sont présentés dans le **TABLEAU M2**.

FIXATION	SÉQUENCE	SOURCE	CONSTRUCTIONS RÉALISÉES
5'	aggcagtctgtcctgaacctgatgacacac	2296-2326	1 ^{er} et 2 ^{ème} tour de N _{1/1} , N _{1/1} * et N _{1/-}
3'	accaagaagtgagaattttgctgtgagatc	1297-1312/3640-3655	1 ^{er} tour de N _{1/1} et N _{1/1} *
5'	gatctcacagcaaaaattctcacttcttggt	3640-3655/1297-1312	1 ^{er} tour de N _{1/1} et N _{1/1} *
3'	tgcttgtttagagtattttcttttctgt	4159-4174/1744-1759	1 ^{er} tour de N _{1/1} et N _{1/1} *
5'	acagaaaaagaaataactctaaacaagca	1744-1759/4159-4174	1 ^{er} tour de N _{1/1} et N _{1/1} *
3'	gaagggccctctagactcgagaagccttgt	Étiquette HA	1 ^{er} et 2 ^{ème} tour de N _{1/1} , N _{1/1} * et N _{1/-}
5'	aaaatattcaccaccatctcatttgcatt	1003-1033	1 ^{er} et 2 ^{ème} tour de N _{2/2} et N _{-/2}
3'	tccaccttctgtgtaattactgaagaagag	3655-3670/1282-1297	1 ^{er} tour de N _{2/2}
5'	ctcttcttcagtaattacacagaaggtgga	1282-1297/3655-3670	1 ^{er} tour de N _{2/2}
3'	gacacagcttcaaatcttctaattatttg	1759-1774/4144-4159	1 ^{er} tour de N _{2/2}
5'	caaataattagaagattgaaagctgtgtc	4144-4159/1759-1774	1 ^{er} tour de N _{2/2}
3'	tgctgttgccttgcgtgaatgttctgacc	2338-2368	1 ^{er} et 2 ^{ème} tour de N _{2/2} et N _{-/2}
5'	tgcttgtttagagttttgctgtgagatc	4159-4174/3640-3655	1 ^{er} tour de N _{1/-}
3'	gatctcacagcaaaaactctaaacaagca	3640-3655/4159-4174	1 ^{er} tour de N _{1/-}
5'	gacacagcttcaaaattactgaagaagag	1759-1774/1282-1297	1 ^{er} tour de N _{-/2}
3'	ctcttcttcagtaatttgaagctgtgtc	1282-1297/1759-1774	1 ^{er} tour de N _{-/2}

TABLEAU M1 : Liste des différents oligonucléotides, chimériques ou non, utilisés pour construire des protéines CFTR avec les NBDs inversés ou supprimés par la technique de SOE. Il est indiqué la localisation dans la séquence de *CFTR* de l'oligonucléotide ainsi que la réaction dans la(les)quelle(s) il est utilisé.

FIXATION	SÉQUENCE	SOURCE	CONSTRUCTION RÉALISÉE
5'	ccaccgcggtggcgccgctctagaactag	Plasmide	$\Delta S6$
3'	gggaaattgccgagttttgattagtgcata	1051-1065/973-987	1 ^{er} tour de $\Delta S6$
5'	tatgcactaatcaaaactcggcaattccc	973-987/1051-1065	1 ^{er} tour de $\Delta S6$
3'	tgctgtgtctttcggatgtttctgacc	2338-2368	1 ^{er} et 2 ^{ème} tour de $\Delta S6$
5'	aggcagtctgtcctgaacctgatgacacac	2296-2326	1 ^{er} et 2 ^{ème} tour de $\Delta S12$
3'	gctatccacatctattcttctctcttc	3451-3465/3370-3384	1 ^{er} tour de $\Delta S12$
5'	gaaggagaaggaagaatagatgtggatagc	3370-3384/3451-3465	1 ^{er} tour de $\Delta S12$
3'	gaagggccctctagactcgagaagccttgt	Étiquette HA	1 ^{er} et 2 ^{ème} tour de $\Delta S12$

TABEAU M2 : Liste des différents oligonucléotides, chimériques ou non, utilisés pour construire des protéines CFTR déletés de certains de ces segments transmembranaires. Il est indiqué la localisation dans la séquence de *CFTR* de l'oligonucléotide ainsi que la réaction dans la(les)quelle(s) il est utilisé.

En raison du faible niveau d'expression obtenu dans les cellules eucaryotes et de la présence de nombreux clones faux-positifs lorsque celles-ci ont été transfectées par le vecteur pcDNA3.1, nos constructions ont été transposées de ce plasmide vers le plasmide pNUT [Haardt M. *et al.*, 1999 ; Benharouga M. *et al.*, 2001].

4. PROTOCOLES UTILISÉS

Dans la première étape de la SOE, nous avons utilisé un mélange réactionnel standard contenant la polymérase Vent (*New England Biolabs*) et les composés suivants :

Matrice d'ADN (1 µg/µL)	1 µL
Oligonucléotide de début (20 pM/µL)	2,5 µL
Oligonucléotide de fin (20 pM/µL)	2,5 µL
Tampon Vent 10×	5 µL
dNTP (2,5 mM)	5 µL
Vent DNA polymerase	1 µL
Eau	qsp 50 µL

Pour la deuxième étape de SOE, nous avons dû adapter le mélange réactionnel standard car la matrice utilisée était les fragments obtenus lors de la première étape de SOE. Le nouveau mélange comprenait les composés suivants :

Matériels & Méthodes

Fragment PCR 1	x μ L
Fragment PCR 2	y μ L
Fragment PCR 3 (si nécessaire)	z μ L
Oligonucléotide de début (20 pM/ μ L)	2,5 μ L
Oligonucléotide de fin (20 pM/ μ L)	2,5 μ L
Tampon Vent 10×	5 μ L
dNTP (2,5 mM)	5 μ L
Vent DNA polymerase	1 μ L
Eau	qsp 50 μ L

Pour les deux étapes de PCR nécessaires à la SOE, le programme utilisé était le même, décrit ci-dessous :

94°C	3 min
94°C	1 min
55°C	1 min
72°C	1 min par kB
72°C	5 min

Nombre de cycles réalisés : 30

B. PLASMIDES UTILISÉS

Les plasmides d'expression eucaryote pcDNA3.1 et pNUT codant pour les protéines CFTR sauvage (wt) ou mutée Δ F508 étiquetés en position C-terminale par une étiquette HA (*HémAgglutinine* du virus *Influenza*, 11 acides aminés : YPYDVDPDYANS) ont été généreusement cédées par le Dr. Gergely Lukacs (McGill University, Montréal, Canada). Les plasmides pcDNA3.1, dont l'agent de sélection dans les cellules eucaryotes est le G418 (*Invitrogen*, France), ont servi de matrice pour la génération des protéines CFTR modifiées, et ces constructions ont ensuite été transférées dans le plasmide pNUT pour la transfection stable. L'agent de sélection de ce plasmide est le Méthotrexate (*Sigma-Aldrich*, France).

C. MÉTHODES COURANTES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

5. PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN

Les fragments d'ADN obtenus par amplification PCR ou après digestions enzymatiques étaient purifiés grâce au kit Geneclean Turbo (*MP Biomedicals*), comme décrit dans le protocole fourni. Brièvement, dans un premier temps, les fragments d'ADN étaient séparés sur gel d'agarose 0,8% et les bandes correspondant aux fragments étaient isolées. L'ADN était ensuite séparé de l'agarose par chauffage dans un bain possédant une forte concentration en sels chaotropiques. Le mélange était alors déposé sur une colonne de purification pour éliminer les sels et les autres contaminants. Après élution, les fragments étaient utilisables pour les étapes suivantes : PCR, digestions ou ligations.

6. LIGATION

Pour les ligations, les quantités respectives de vecteur et d'insert digérés et purifiés étaient ajustées pour être dans un rapport moléculaire théorique de 1 pour 3 à 5. Les réactions de ligation étaient effectuées comme décrit dans le protocole du fournisseur, dans le milieu réactionnel suivant :

Vecteur digéré	x μL
Tampon de ligation 2 \times (<i>Roche Applied Science</i> , France)	5 μL
Tampon de ligation 5 \times (<i>Roche Applied Science</i> , France)	2 μL
Fragment PCR digéré	y μL
T4 DNA ligase (<i>Roche Applied Science</i> , France)	1 μL
Eau stérile	qsp 20 μL

Le mélange réactionnel était incubé 30 min à 2 h à température ambiante, puis les plasmides ainsi générés étaient introduits pour amplification dans des bactéries ultra-compétentes par transformation.

7. TRANSFORMATION DES BACTÉRIES COMPÉTENTES

La transformation est un phénomène naturel d'échange de matériel génétique entre deux bactéries. En laboratoire, la transformation artificielle, maîtrisée, est un phénomène couramment utilisé pour amplifier du matériel génétique à étudier. La méthode utilisée est décrite ci-dessous:

5 μL d'ADN d'intérêt (mélange de ligation ou plasmide à amplifier) étaient prélevés et mis en présence de 50 μL de bactéries *E. coli* ultra-compétentes TOP10 (*Invitrogen*, France). Après incubation 30 min dans la glace, les bactéries étaient transformées par choc thermique de 40 s à 42°C puis de quelques minutes dans la glace. Les bactéries étaient alors diluées dans 350 μL de milieu SOC (Super Optimized Culture, *Invitrogen*, France) et incubées 1 h à 37°C pour permettre l'expression du gène de résistance à l'antibiotique porté par le vecteur et ainsi faciliter la sélection des clones positifs. Ces précultures bactériennes étaient ensuite étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB (Luria-Bertani)-Agar et supplémenté par la concentration d'antibiotique adéquate. Les plasmides pCDNA3.1 et pNUT, utilisés ici, portent un gène de résistance à l'ampicilline, c'est donc cet antibiotique, à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$, qui étaient utilisé pour supplémenter le milieu de culture. Les boîtes étaient ensuite incubée la nuit à 37°C.

8. PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE

La purification des plasmides amplifiés à partir de cultures bactériennes a été réalisée par les techniques de Midiprep et de Miniprep. Les Minipreps et les Midipreps permettent d'extraire l'ADN plasmidique par lyse alcaline grâce à un kit fourni par MP Biomedicals. Le principe repose sur une dénaturation différentielle de l'ADN génomique de structure relâchée et de l'ADN plasmidique superenroulé. Lorsque la soude est ajoutée au lysat cellulaire, seul l'ADN génomique est dénaturé de façon irréversible. L'addition d'acide et de sel permet la réassociation en réseau insoluble de l'ADN chromosomique, alors que l'ADN plasmidique reprend sa forme native soluble. Une centrifugation permet l'élimination d'une grande partie des protéines, de l'ARN et de l'ADN chromosomique.

Dans le cas des Minipreps, nécessaires à la sélection des plasmides porteurs de gènes recombinants, les cultures bactériennes étaient réalisées dans 3 mL de milieu LB supplémenté en ampicilline (100 µg/mL).

Dans le cas des Midipreps, le principe reste le même, la seule différence étant la quantité d'ADN purifié ainsi que le degré de pureté de cet ADN. La préparation était réalisée à partir de 50 mL de culture bactérienne et passée sur colonne d'affinité pour augmenter la pureté. Tous les produits nécessaires à l'extraction ainsi que les colonnes d'affinité étaient fournis dans le kit MP PhoenIX, de même que le protocole utilisé (*MP Biomedicals*).

Par la suite, l'ADN plasmidique était précipité par de l'isopropanol, puis rincé par de l'éthanol à 70% et repris dans de l'eau stérile. La concentration en ADN de la préparation était alors estimée au spectrophotomètre par lecture de la densité optique à 260 nm. Le rapport DO_{260}/DO_{280} était aussi calculé, pour estimer la pureté de notre préparation. Ce rapport doit être compris entre 1,6 et 2 pour que la préparation soit considérée comme correcte.

L'ensemble des constructions portées par les plasmides ainsi purifiés était contrôlé par digestions enzymatiques et séquençage.

II. CULTURE CELLULAIRE

E. LIGNÉES CELLULAIRES

Au cours de cette étude, deux lignées cellulaires ont été utilisées: la lignée BHK-21 et la lignée COS-7.

1. LA LIGNÉE BHK-21

La lignée BHK-21 (Baby Hamster Kidney) dérive de la lignée source BHK C-13 obtenue à partir de reins de hamster doré ou syrien (*Mesocricetus auratus*). Ce sont des cellules rénales fibroblastiques adhérentes développées pour la première fois par Macpherson et Stoker [Stoker et Macpherson, 1964]. La lignée BHK-21 est couramment utilisée pour la caractérisation biochimique de protéines recombinantes qui y sont exprimées soit de façon transitoire, soit de façon stable. Ces cellules sont aussi utilisées pour la production de vaccins ou l'étude du métabolisme cellulaire.

2. LA LIGNÉE COS-7

La lignée COS-7 est une lignée fibroblastique d'origine rénale provenant du singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*). Elle a été obtenue après transformation par l'antigène T de SV40 (Simian Vacuolating Agent 40) muté au niveau de son origine de réplication (SV40 ori-defective) pour éviter la réplication virale. Ces cellules sont surtout utilisées en imagerie car, du fait de leur étalement, elles permettent une excellente visualisation des différents compartiments intracellulaires. Elles sont aussi connues pour leur production accrue de protéines recombinantes par transfection transitoire.

F. CONDITIONS DE CULTURE

Les cellules BHK-21 et COS-7 étaient maintenues en culture dans une boîte de 10 cm contenant le milieu DMEM/F-12 pH 7,5 (Dubelco's Modified Eagle Medium/Ham F12; *Invitrogen*, France) supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal (SVF, *Invitrogen*, France) et par un mélange d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine, Amphotéricine B et Fungizone[®], *Invitrogen*, France), puis incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

G. REPIQUAGE

Les cellules étaient repiquées tous les deux jours, à confluence. Pour cela, les cellules adhérentes en culture étaient lavées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, *Invitrogen*, France) sans calcium (Ca²⁺) ni magnésium (Mg²⁺), puis décollées par ajout de trypsine (*Invitrogen*, France) à 0,05% à température ambiante. La trypsine était ensuite inhibée par l'addition du Ca²⁺ du milieu de culture. Les cellules étaient alors resuspendues à l'aide d'une pipette stérile puis partagées dans des boîtes de 10 cm (en général, une boîte 10 cm est partagée en deux boîtes 10 cm).

H. CONGÉLATION

Après lavage au PBS, décrochage des cellules adhérentes par la trypsine à 0,05% et resuspension de ces cellules dans du milieu de culture, celles-ci étaient centrifugées 2 min à 2000xg à température ambiante. Le culot cellulaire était alors resuspendu dans le milieu de congélation suivant : 10% DMSO (Diméthylsulfoxyde) (*Sigma-Aldrich*, France), 20% SVF, et 70% milieu DMEM/HAM-F12.

Les cellules étaient par la suite placées successivement pendant 4h à -20°C, puis transférées à -80°C pendant ~ 4 mois et finalement stockées indéfiniment dans de l'azote liquide (-180°C). La décongélation peut se faire à n'importe quel moment du processus.

III. EXPRESSION DES PROTÉINES RECOMBINANTES

Pour éviter le phénomène de variations clonales qui peut altérer la synthèse, la maturation ou le trafic des protéines recombinantes stablement transfectées, nous avons comparé l'expression des protéines recombinantes transfectées transitoirement ou stablement. Ces deux types de transfections ont été réalisés dans deux lignées cellulaires différentes, les BHK-21 et les COS-7, dans le but de s'affranchir des effets propres à l'expression de protéines dans un système hétérologue.

D. TRANSFECTIONS STABLES

1. TRANSFECTION STABLE AU PHOSPHATE DE CALCIUM

Les cellules BHK-21 ont été utilisées pour exprimer de façon stable les protéines CFTR modifiées. Les cellules BHK-21 constituent un très bon modèle pour étudier biochimiquement et métaboliquement le comportement cellulaire de CFTR, d'autant plus que celles-ci n'expriment pas de manière endogène la protéine CFTR, et produisent, une fois transfectées, une protéine CFTR correctement repliée et parfaitement fonctionnelle. Après une tentative infructueuse avec le plasmide pcDNA3.1, l'expression des protéines CFTR modifiées a finalement été réalisée par introduction dans les cellules BHK-21 du plasmide pNUT [Benharouga *et al.*, 2001] portant les gènes *cftr* modifiés par SOE. Ce plasmide contient en effet un gène muté codant pour l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) impliquée dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Cette mutation empêche l'inhibition de l'activité de DHFR par le méthotrexate. Ce dernier est capable d'inhiber spécifiquement l'enzyme DHFR sauvage exprimée de manière endogène dans les cellules BHK-21 et d'entraîner l'apoptose de la cellule au bout de 24 h de traitement. L'introduction conjointe de CFTR et de

la DHFR mutée au sein du plasmide nous permet de procéder à la sélection des seules cellules exprimant la DHFR mutée autrement dit contenant le plasmide d'intérêt.

Ainsi, 15 µg du plasmide comportant l'ADNc de la protéine d'intérêt étaient mélangé avec 450 µL d'eau stérile, 50 µL de CaCl_2 2,5 M et 500 µL de BES 2× (*Sigma-Aldrich*, France). Pour permettre la complexation du plasmide avec le Ca^{2+} et le BES, le mélange était incubé au moins 20 min à température ambiante avant d'être rajouté aux cellules en culture. Ce procédé étant très toxique pour les cellules, nous remplacions le milieu de transfection par le milieu de culture normal au bout de 6h pour minimiser son effet.

Pour faciliter la détection en augmentant la spécificité de l'interaction entre la protéine et l'anticorps, l'ensemble des protéines ont été marquées par l'étiquette HA. Le HA a été placé au niveau de la partie C-terminale, entre le dernier acide aminé de CFTR et le codon stop. Toutes les vérifications avaient été réalisées pour s'assurer que le HA ne perturbe pas la biosynthèse, la maturation, la stabilité et la fonction de la protéine CFTR [Haardt M. *et al.*, 2001].

2. SELECTION DES CLONES POSITIFS

48 h après la transfection, les cellules étaient incubées dans un milieu de sélection contenant 500 µM de Méthotrexate. Après deux semaines de sélection, les cellules résistantes au méthotrexate formaient des clones. Ceux-ci étaient alors lavés avec du PBS déplété en Ca^{2+} et en Mg^{2+} , décrochés à l'aide de la trypsine et placés dans une plaque de 24 puits en présence de 1mL de milieu de culture normal contenant du méthotrexate à 300 µM.

Les plaques étaient par la suite mises en culture à 37°C sous 5% de CO_2 . A 100% de confluence les clones étaient transférés dans des plaques de 12 puits, puis dans les boîtes de 10 cm. Les clones positifs étaient identifiés par deux techniques : immunodétection et immunofluorescence.

4. CLONAGE PAR DILUTION

Lors de notre tentative de générer des lignées stables avec nos constructions portées par le plasmide pcDNA3.1, nous avons envisager la technique de clonage par dilution. Pour cela, après transfection et sélection de cellules résistantes au G418 (agent de sélection utilisé avec pcDNA3.1, à une concentration de 1 mg/mL), les cellules étaientensemencées à une concentration théorique d'une cellule par puit d'une plaque 24 puits. Lorsque la confluence atteignait 80%, les cellules étaient alors repiquées dans des boites de 6 cm de diamètre.

E. TRANSFECTIONS TRANSITOIRES

Pour les transfections transitoires, les cellules COS-7 ont été utilisées. La transfection transitoire était réalisée à l'aide du kit FuGENE 6 (*Roche Applied Science*, France). Pour ce faire, 18 μ L de FuGENE mélangé avec 276 μ L de milieu de culture sans sérum étaient incubés 5 min à température ambiante, puis 6 μ g de plasmide pcDNA3.1 codant l'ADNc de la protéine d'intérêt étaient ajoutés. L'ensemble était incubé au moins 20 min à température ambiante avant d'être rajouté sur les cellules en culture. Après 24 h, les cellules étaient partagées en deux lots pour être utilisées, par la suite (au bout de 48 h), pour les expériences d'une part d'immunofluorescence et d'autre part d'immunodétection (Western Blot). Aucune toxicité cellulaire n'a été observée au bout de 24 h de présence de FuGENE 6.

IV. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

F. EXTRACTION PROTÉIQUE

A confluence et après avoir subi un traitement lorsque ceci était nécessaire, les cellules transfectées de manière stable ou transitoire étaient placées à 4°C et rincées deux fois avec du PBS froid. Les cellules étaient alors resuspendues et récupérées dans des tubes Eppendorf froids. L'extraction protéique était réalisée dans du tampon RIPA pH 8 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1% et déoxycholate de sodium 0,5%) contenant des inhibiteurs de protéases (2 mg/mL de Iodoacétamide, 1 mM de PMSF et 10 μ g/mL du mélange leupeptine et pepstatine) (*Sigma-Aldrich*, France) pendant 20 min à 4°C. Les cellules non solubilisées, les débris et les noyaux étaient ensuite culottés par centrifugation (15000xg, 15 min à 4°C). Le surnageant était prélevé et dénaturé par ajout de LSB 2 \times final et par chauffage 5 min à 50°C.

G. DOSAGE PROTÉIQUE

La concentration protéique des différents échantillons était déterminée par le dosage colorimétrique BCA Protein Assay (*Pierce*, France). Cette méthode utilise l'acide bicinchoninique (BCA) comme réactif de détection des ions Cu^+ , qui se forment lorsque les ions Cu^{2+} sont réduits par les protéines dans un environnement alcalin. Un produit de réaction violet se forme alors et son absorbance à 562 nm est mesurée par spectrophotométrie. Après l'extraction protéique, 5 μ L d'échantillon à doser étaient ajoutés au mélange réactionnel contenant 45 μ L d'eau distillée et 50 μ L de SDS 1%. 1 mL de solution contenant les réactifs A et B (ratio 50:1) était ajouté et les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30 min avant

mesure de l'absorbance à 562 nm par spectrophotométrie. Le calcul de la concentration protéique des échantillons se faisait par comparaison à une courbe de calibration réalisée avec de la BSA (sérumalbumine bovine).

H. DÉTERMINATION DU PROFIL GLYCOSIDIQUE

Le niveau de maturation des protéines N-glycosylées comme CFTR peut être déterminé par digestion par des endoglycosidases. En effet les protéines nouvellement synthétisées sont glycosylées au niveau de résidus asparagine au cours de leur biosynthèse. L'endoglycosidase H (EndoH) est une enzyme qui clive les N-glycanes riches en mannose après le premier résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc) lié à l'asparagine (**FIGURE M2**). La peptide N-glycosidase F (PNGase F) est une amidase qui clive les oligosaccharides riches en mannose ou complexes entre le GlcNAc et l'asparagine (**FIGURE M2**). Dans les deux cas, la réaction est réalisée sur 100µg d'extraits protéiques comme décrit par le fabricant (*New England BioLabs*, France). Brièvement, 100 µg d'extraits protéiques étaient incubés pendant 10 min à 37°C dans du tampon de dénaturation. Le pH de la réaction était par la suite ajusté avec du tampon G5 (0,5 M citrate de sodium, pH 5,5) pour l'Endo H ou avec le tampon G7 (0,5 M phosphate de sodium, pH 7,5) pour la PNGase F. Pour cette dernière enzyme, 1% de NP-40 final était aussi ajouté. Les échantillons étaient ensuite incubés avec l'Endo H (7 µg/mL) ou la PNGase F (31 µg/mL) pendant 3 h à 33°C puis 30 min à 37°C. Finalement, les échantillons étaient dénaturés 5 min à 50°C dans du LSB 2× et conservés à -80°C.

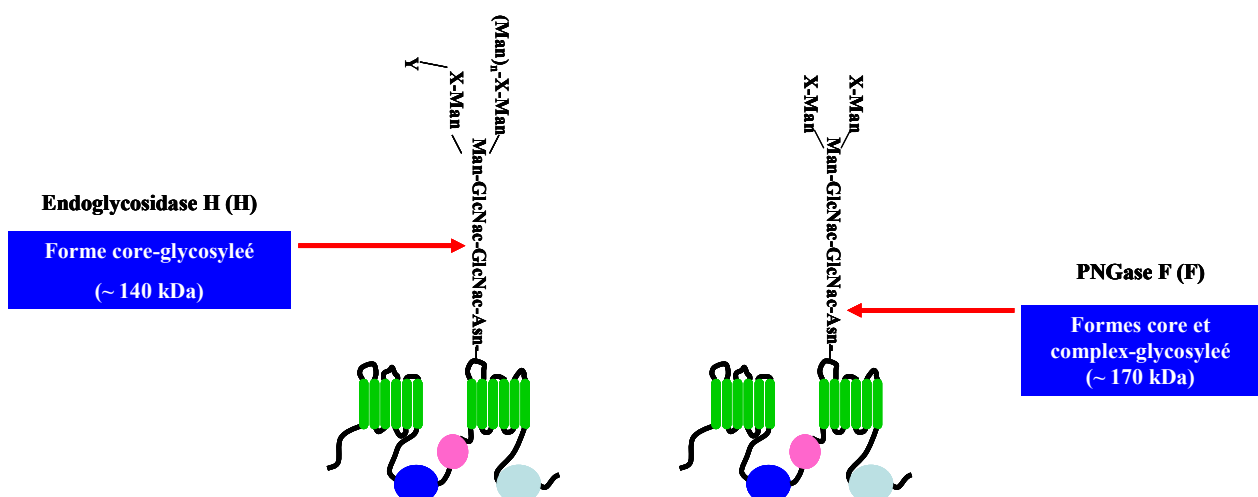


FIGURE M2: Schéma représentant les sites de coupures de l'endoglycosidase H et de la peptide N-glycosydase F sur la partie glycosidique de la protéine CFTR.

I. FIXATION DE L'ATP SUR LES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES

La liaison de l'ATP au niveau des NBDs des protéines CFTR sauvage, mutée F508del et modifiées a été étudiée par fixation de celles-ci sur une colonne d'ATP-agarose. Les cellules BHK-21 exprimant de manière stable les différentes protéines étaient d'abord lavées trois fois avec le tampon de lyse hypotonique (7,5 mM Tris HCl pH 7,4), puis incubées pendant 5 min dans ce même tampon additionné de 200 μ M d'orthovanadate de sodium et 0,1 mM d'EGTA. Une fois décollées, celles-ci étaient centrifugées à 13200xg pendant 5 min. Les culots étaient alors resuspendus dans 900 μ L de tampon d'extraction (0,2% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7,4) additionné des inhibiteurs de protéases. A ces extraits ainsi obtenus étaient ajoutés de l'ATP-agarose lavé avec le tampon d'extraction, en présence de 3 mM de $MgCl_2$ et de 200 μ M d'orthovanadate de sodium. Le mélange était alors incubé 1 h à 4°C. Les protéines non liées étaient par la suite éliminées par trois lavages avec 1 mL de tampon d'extraction. L'élution était finalement réalisée avec du LSB 2X (Laemmli Sample Buffer, 6% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% Glycérol, 0,04% bleu de bromophénol) additionné de 10% de β -mercaptoéthanol pendant 10 min à 37°C. La présence de CFTR était déterminée par immunodétection en utilisant l'anticorps anti-HA.

J. MARQUAGE MÉTABOLIQUE AU S^{35}

3. PRÉSENTATION

La technique de marquage métabolique au S^{35} (pulse-chase en terminaison anglo-saxonne) a pour intérêt de suivre *in vivo* le devenir d'une protéine au cours du temps. Cette technique consiste en un marquage des protéines néosynthétisées par incorporation de méthionine et de cystéine marquées au S^{35} pendant une période déterminée (pulse ou poussée), puis en un suivi de ces protéines marquées au cours du temps dans un environnement contenant ces mêmes acides aminés froids (chase ou chasse). Dans notre étude, le marquage métabolique au S^{35} nous a permis de déterminer la durée de vie de la forme immature, le temps de conversion de la forme immature vers la forme mature ainsi que la stabilité de cette forme mature lorsque celle-ci est présente.

4. PROTOCOLE

A environ 90% de confluence, les cellules BHK-21 transfectées de manière stable étaient rincées deux fois avec du PBS contenant 0,1 mM de Ca^{2+} et 2 mM Mg^{2+} , puis incubées 40

min dans un milieu DMEM/F-12 ne contenant ni méthionine ni cystéine (*Invitrogen*, France) à 37°C. Celles-ci étaient ensuite incubées à 37°C dans le même milieu supplémenté par 200 µCi de méthionine et cystéine marquées au S³⁵ (PRO-MIX™ L-[³⁵S] *in vitro* cell labelling mix, *Amersham Biosciences*, France) pendant la durée variable selon le processus étudié (**FIGURE M3**). Les protéines radiomarquées nouvellement synthétisées durant la période de pulse pouvaient ainsi être suivie au cours du temps. Après deux rinçages au PBS contenant 0,1 mM de Ca²⁺ et 2 mM Mg²⁺, les cellules étaient alors incubées pendant une durée variable (de 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 ou 24 h) dans le milieu de culture habituel.

A la fin de la période de chasse, les cellules étaient placées à 4°C, rincées deux fois avec du PBS froid puis incubées dans 1 mL de RIPA contenant des inhibiteurs de protéases pendant 20 min. Les cellules non lysées, les débris et les noyaux étaient ensuite culottés par centrifugation (15000xg, 15 min à 4°C), et les surnageants étaient prélevés et déposés dans des tubes Eppendorf froids. L'anticorps anti-HA (*Covance*, USA) était alors ajouté à chaque surnageant et les mélanges étaient incubés 2 h à 4°C sous agitation. Après ajout de 40 µL de protéines G Sépharose (*Sigma-Aldrich*, France) et incubation sous agitation pendant 1 h à 4°C, les protéines immunoprécipitées étaient rincées six fois avec du RIPA froid puis éluées après une incubation de 30 min dans 40 µL de LSB 2× contenant 10% de β-mercaptoéthanol à 37°C.

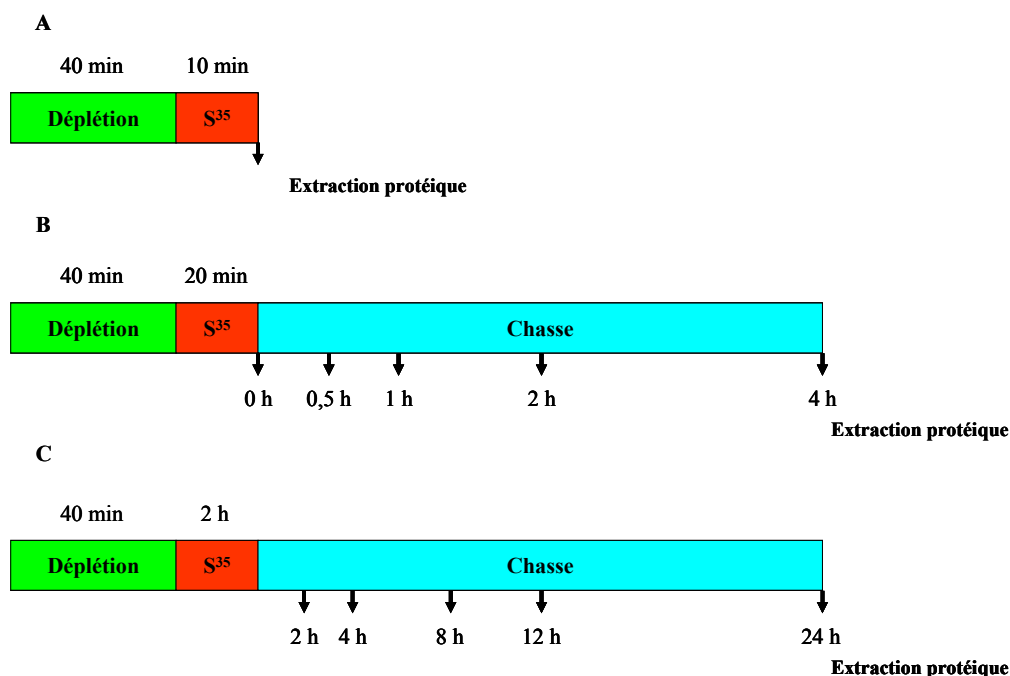


FIGURE M3 : Schéma représentant les différents protocoles de marquage métabolique au S³⁵ utilisés selon le processus étudié. A représente le protocole utilisé pour étudier la biosynthèse, B celui pour étudier la maturation et C celui utilisé pour étudier la stabilité et la thermostabilité des protéines CFTR.

Les protéines immunoprécipitées étaient ensuite séparées en condition dénaturante (SDS-PAGE) selon la technique de Laemmli [Laemmli U.K., 1970] sur des gels d'acrylamide à 7%. Ces protéines étaient ensuite fixées pendant 30 min dans un tampon contenant 10% d'acide acétique et 40% de méthanol. Après un rinçage de 5 min dans de l'eau, les gels étaient séchés sous vide pendant 75 min à 70°C. Les gels secs étaient par la suite exposés dans une cassette Kodak BioMax (Kodak, France) contenant un film Kodak (Kodak BioMax MS film, Kodak, France) pendant 3 à 7 jours à -80°C. Les films sont enfin révélés par autoradiographie. Les mesures d'intensité de radioactivité ont été réalisées au Phosphorimager (BioRad, France) à l'aide du logiciel Quantity One (BioRad, France).

K. THERMOSTABILITÉ

La méthode de thermostabilité nous a permis d'étudier de manière indirecte les différences conformationnelles que pouvaient porter les protéines CFTR modifiées par rapport à la protéine sauvage. Cette méthode, déjà utilisée sur CFTR-F508del [Sharma M. *et al.*, 2001], est basée sur la technique de marquage métabolique au S³⁵. La seule modification apportée au protocole décrit ci-dessus (FIGURE M3, panneau C) est que les périodes de chasse étaient réalisées à différentes températures, 26, 37 ou 40°C.

L. THERMOAGRÉGATION

Dans le but d'étudier indirectement les modifications structurales susceptibles de différencier les protéines CFTR modifiées de la protéine CFTR sauvage, la température d'agrégation, température à laquelle 50% de la protéine est convertie en agrégats résistant au SDS, a été mesurée selon la méthode de thermoagrégation [Sharma M. *et al.*, 2001].

Pour cela, les protéines issues de BHK-21 exprimant de manière stable CFTR sauvage, mutée ou modifiées étaient extraites avec du tampon RIPA, solubilisées dans du LSB 2× puis aliquotées par 50 µg et incubés 5 min à 37, 60, 80 ou 100°C en présence ou non de 8 M d'urée (agent chaotrope dénaturant empêchant l'agrégation température-dépendante). Les agrégats macromoléculaires résistants au SDS étaient sédimentés par centrifugation 15 min à 15000×g à 4°C. Les protéines CFTR monomériques contenues dans le surnageant étaient alors récupérées, séparées sur gels d'acrylamide 7% en conditions dénaturantes (voir partie IV.H.) et visualisées par immunodétection à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-HA (Covance, USA). La quantification de l'intensité des bandes était réalisée à l'aide du logiciel

SCION (*Scion Corporation*, USA), puis l'intensité de chaque bande était ramenée en pourcentage par rapport à la quantité de protéines à 37°C.

M. PROTÉOLYSES MÉNAGÉES A LA TRYPSINE

L'étude de la conformation par rapport à la protéine sauvage et de l'orientation par rapport à la bicouche lipidique des protéine CFTR modifiées ont été réalisés par protéolyse ménagée sur des microsomes.

1. ISOLATION DES MICROSOMES

L'isolation de microsomes à partir de cellules BHK-21 exprimant de manière stable les protéines CFTR sauvage, mutée F508del et modifiées a été réalisée en utilisant des centrifugations différentielles après éclatement des cellules sous azote à une pression de 2,5 bars (bombe à cavitation, *Kontes*, USA). Cette méthode permet d'obtenir des microsomes dont la face cytoplasmique est orientée vers l'extérieur. Nous avons ainsi obtenu des protéines CFTR dont les domaines cytoplasmiques sont accessibles à la trypsine.

Les cellules étaient cultivées jusqu'à confluence dans des boîtes de culture de 150 mm de diamètre. Après deux rinçages au PBS froid, celles-ci étaient resuspendues et récupérées dans des tubes Falcon 50 mL. Elles étaient alors rincées deux fois dans un tampon d'homogénéisation (0,25 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 6,8) et reprises par ce même tampon supplémenté par des inhibiteurs de protéases (2 mg/mL d'Iodoacétamide, 1 mM de PMSF et 10 µg/mL du mélange leupeptine et pepstatine) (*Sigma-Aldrich*, France). Les cellules étaient progressivement cassées en relâchant la pression en azote après une incubation de 4 min à 2,5 bars dans la glace. L'homogénat était alors centrifugé 5 min à 1500×g à 4°C pour éliminer les noyaux et les cellules encore intactes. Le surnageant était récupéré et centrifugé 10 min à 9800×g à 4°C pour éliminer les microsomes lourds, dont ceux issus des mitochondries. Les microsomes légers, incluant ceux issus du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, des endosomes et de la membrane plasmique, étaient isolés du surnageant par ultracentrifugation 50 min à 50000×g à 4°C. Le culot de microsome était alors resuspendu dans un tampon de resuspension (0,25 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,6) à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce. La préparation de microsomes était alors aliquotée, et les aliquots étaient rapidement congelés dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

2. PROTÉOLYSE MÉNAGÉE

Pour la protéolyse ménagée, les microsomes ainsi obtenus étaient d'abord aliquotés à 100 µg de protéines dans des tubes Eppendorf froids (concentration finale de protéines dans le milieu réactionnel: entre 1,2 et 1,5 µg/µL) puis immédiatement digérés (pour éviter la protéolyse spontanée) en présence de concentrations croissantes de trypsine (*Sigma-Aldrich*, France) pendant 15 min à 4°C. La réaction était ensuite stoppée en inhibant l'activité de la trypsine par ajout de 1 mM de PMSF (*Sigma-Aldrich*, France) puis les échantillons étaient dénaturés par incubation dans du LSB 2× pendant 10 min à 50°C. Après séparation des fragments peptidiques sur gel d'acrylamide 11% en condition dénaturante, ceux-ci étaient visualisés par immunodétection à l'aide de l'anticorps monoclonal L12B4 (*Chemicon*, USA) reconnaissant spécifiquement le domaine NBD1 de CFTR.

3. ORIENTATION DE CFTR PAR RAPPORT A LA BICOUCHE LIPIDIQUE

Dans le but de contrôler l'orientation par rapport à la bicouche lipidique des protéines CFTR ne possédant plus les domaines S6 et S12, nous avons réalisé des expériences de protéolyse à la trypsine. Dans ces expériences, nous avons utilisé des microsomes issus de cellules BHK-21 exprimant de manière stable nos différentes constructions. 70µg de protéines microsomales étaient digérées par 40 µg/mL de Trypsine en présence ou non de 0.05% TritonX-100 pendant 15 min à 4°C. La réaction était arrêtée par 1 mM de PMSF puis les protéines étaient dénaturées 20 min à 37 °C dans du LSB 2×. Les peptides obtenus étaient alors séparés sur gels SDS-PAGE à 11% d'acrylamide et révélés par immunodétection à l'aide de l'anticorps anti-CFTR L12B4 (*Chemicon*, USA).

J. ÉLECTROPHORÈSE ET IMMUNODÉTECTION

Les protéines CFTR sauvage, mutée F508del ou modifiées étaient séparées en condition dénaturante (SDS-PAGE) selon la technique de Laemmli [Laemmli U.K., 1970] sur des gels d'acrylamide à 7%. Les protéines étaient séparées pendant 20 min à 60 V puis 2 h à 140 V, en présence de tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM et SDS 0,1%). Lorsqu'elles étaient digérées à la trypsine, ces protéines étaient séparées par SDS-PAGE sur des gels d'acrylamide à 11% pendant 20 min à 60 V puis 1 h 30 de migration à 140 V.

Ces protéines étaient par la suite transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm de porosité ; *Biorad*, France) durant 1 h 20 à 100 V et à 4°C dans le tampon de transfert

(Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM et méthanol 20%). L'immunodétection était réalisée après saturation des sites non spécifiques au niveau de la membrane de nitrocellulose par du tampon de blocage (PBS, 5% de lait écrémé, 0,1% Tween 20) pendant la nuit à 4°C sous agitation. L'incubation avec les anticorps monoclonaux anti-HA (*Covance*, USA) ou anti-CFTR clones L12B4 et M3A7 (*Chemicon*, USA) était réalisé à température ambiante en présence de tampon de blocage pendant 1 h. La détection du complexe anticorps-antigène se faisait grâce à un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase et à une réaction de chimiluminescence (Kit ECL Western Blotting, *Amersham Biosciences*, France).

V. IMMUNOLOCALISATION CELLULAIRE

La technique d'immunofluorescence indirecte permet de localiser une protéine dans un tissu ou une cellule à l'aide d'un anticorps primaire spécifique puis un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome reconnaissant la région constante Fc de l'anticorps primaire. La fluorescence est ensuite détectée par microscopie classique ou confocale.

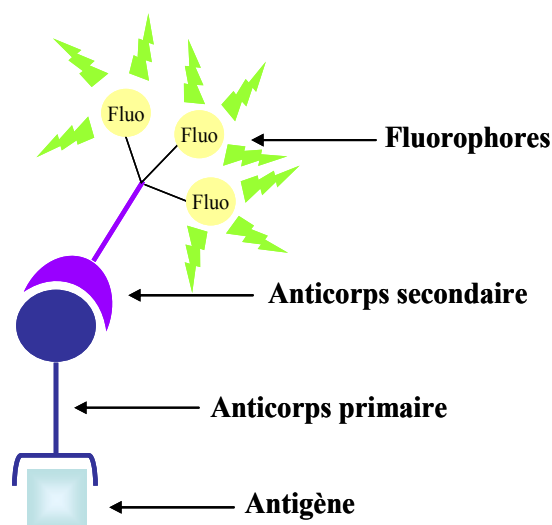


FIGURE M3: Schéma représentant le principe de l'immunofluorescence indirecte.

Pour les expériences d'immunolocalisation, les cellules étaient cultivées sur des lamelles de 12 mm de diamètre. Les cellules exprimant les protéines CFTR-HA sauvage, mutée F508del et modifiées étaient dans un premier temps fixées pendant 20 min à température ambiante par du paraformaldéhyde à 4% (*Sigma-Aldrich*, France). Les cellules étaient ensuite perméabilisées avec 0,2% de triton X-100 pendant 5 min puis les sites étaient saturés pendant 1 h avec du tampon de blocage (0,5% BSA dans du PBS contenant 0,1 mM de Ca^{2+} et 2 mM Mg^{2+}). Les incubations successives avec l'anticorps primaire anti-HA (*Covance*, 1h à

température ambiante) et l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 488 (*Invitrogen*, France) nous permettait de détecter au niveau cellulaire le complexe anticorps-antigène fluorescent. La lamelle était ensuite montée sur une lame à l'aide du milieu de montage (Vectashield® with Dapi, *Abcys*, France).

Le microscope confocal à balayage laser nous a permis de visualiser les complexes protéines d'intérêt-anticorps marqués au niveau cellulaire. La technique d'imagerie confocale à fluorescence permet d'obtenir des images de grande résolution de coupes « optiques » de l'échantillon grâce à une projection sur l'axe Z. Basée sur l'élimination des signaux de fluorescence provenant des régions situées en dehors du plan focal, cette technique donne ainsi accès à des informations situées à l'intérieur des cellules.

Le système disponible au sein de l'institut est un microscope Leica TCS SP2. Cette unité est couplée à un microscope équipé d'un objectif 63× à immersion à huile. Le système possède deux lasers : un UV et une Argon permettant d'obtenir 8 raies d'excitation (351, 354, 458, 476, 488, 514, 543 et 633 nm), couvrant ainsi tout le spectre d'excitation. L'acquisition de la fluorescence, la reconstitution des images et les échelles sont données par le logiciel contrôlant l'unité centrale : Leica confocal software (*Leica*, France).

VI. MESURES DE L'ACTIVITÉ CANAL Cl DE CFTR

A. TECHNIQUE D'EFFLUX D'IODURES

La mesure d'efflux d'iodures est la méthode la plus utilisée pour mesurer l'activité canal Cl⁻ de CFTR. Cette méthode repose sur la mesure du changement de concentration en ions iodure I⁻ de part et d'autre de la membrane plasmique des cellules exprimant les protéines CFTR, mutée F508del ou modifiées. La pertinence de l'utilisation des ions I⁻ plutôt que des ions Cl⁻ est démontrée par l'étude de la sélectivité ionique de CFTR [Venglarik C.J. *et al.*, 1990].

Le principe de la technique, représenté sur la **FIGURE M4**, est le suivant : un milieu riche en I⁻ est disposé au niveau extracellulaire. Les ions I⁻ vont alors s'équilibrer de part et d'autre de la membrane, le milieu extracellulaire est alors remplacé par un milieu sans I⁻, et le relargage des ions I⁻ par la cellule est mesuré après stimulation.

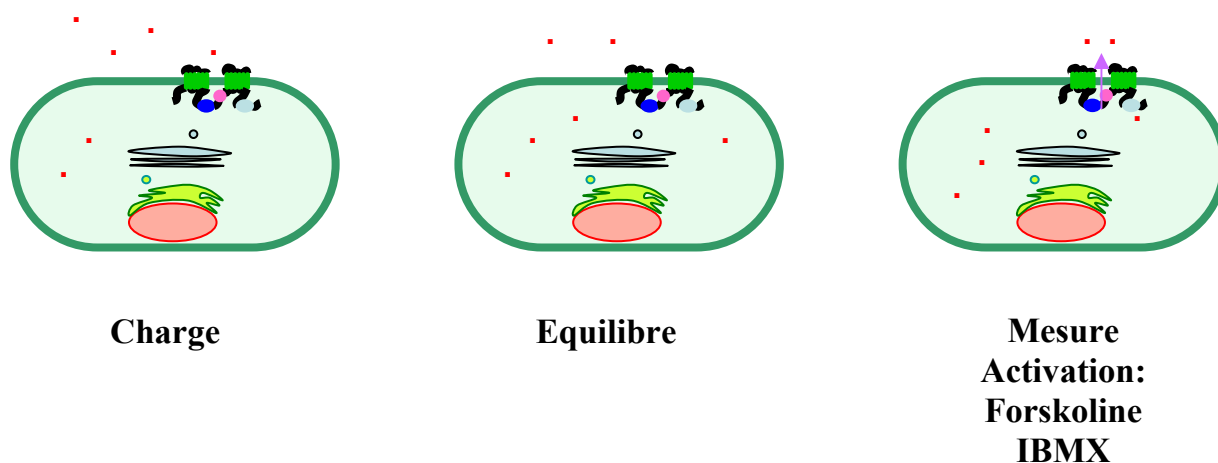


FIGURE M4: Représentation schématique du principe de la technique d'efflux d'iode utilisée pour étudier l'activité canal Cl^- de CFTR. Les ions I^- sont représentés par des points rouges.

Le protocole suivi est le suivant: les cellules BHK-21 sauvages, exprimant de manière stable CFTR, CFTR-F508del ou les protéines CFTR modifiées étaient cultivées dans des plaques 12 puits jusqu'à confluence. Les cellules étaient ensuite rincées deux fois et incubées 1 h avec un tampon de charge, riche en I^- (136 mM NaI, 3 mM KNO_3 , 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 20 mM HEPES, 11 mM glucose, pH 7,4). Les cellules étaient ensuite rincées douze fois avec le tampon d'efflux (même tampon que le tampon de charge, la seule différence est que 136 mM NaNO_3 remplacent les 136 mM de NaI). 1 mL de milieu d'efflux était alors ajouté dans chaque puit et toutes les minutes pendant 8 min, le milieu surnageant était collecté. Au bout de la quatrième minute de récolte, le milieu d'efflux ajouté était supplémenté par 20 μM de Forskolin (*Sigma-Aldrich*, France) et 200 μM d'IBMX (3-isobutyl 1-méthylxanthine; *Sigma-Aldrich*, France) sur la moitié des puits pour activer CFTR.

La concentration en I^- des surnageants récoltés était déterminée grâce à une électrode à iode (Iodide combination electrode I801, *WTW*, Allemagne) après calibration. La réalisation d'une courbe étalon couvrant une gamme de concentrations d' I^- , de 0,1 à 1000 μM , nous a permis de déterminer une tangente dont la pente nous a permis de déterminer la concentration correspondant à chaque voltage.

B. TECHNIQUE DE PATCH-CLAMP

Le passage d'ions à travers les membranes biologiques s'effectue par le biais de canaux ioniques pouvant adopter plusieurs conformations. On ne considère cependant en général que deux de ces conformations: les états "ouvert" et "fermé". Ces deux états correspondent au

passage ou non des ions à travers ces pores. Le sens et l'intensité de ces mouvements ioniques dépendent, pour chaque espèce ionique, des forces de perméation liées à la force de diffusion, qui tend à l'équilibre des concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane, et à la force électromotrice, qui dépend de la valeur du potentiel de membrane. La technique de patch-clamp permet la mesure et l'étude des variations de courant induites par les mouvements ioniques transmembranaires. Cette technique a été mise au point par Neher et Sackman et a valu à ses auteurs le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1992 (Neher E. & Sakmann B., 1976).

LA technique consiste à réaliser un scellement entre une pipette de verre et la membrane plasmique d'une cellule. Il existe alors plusieurs configurations possibles selon l'étude. Dans notre cas, nous avons utilisé la configuration appelée "cellule entière" (whole-cell patch-clamp), permettant ainsi l'enregistrement de l'activité de l'ensemble des canaux membranaires.

Ces expériences ont été réalisées sur des cellules BHK-21 exprimant de manière stable les protéines CFTR sauvage et modifiées, en collaboration dans le laboratoire du Dr. Marc Chanson (Université de Genève, Genève, Suisse).

VII. STATISTIQUES

Chacune des expériences présentées dans cette étude a été répétée au minimum trois fois. Pour chacune de ces expériences, nous avons calculé une erreur standard à partir de ces répétitions afin de valider nos résultats.

Résultats

Partie I

I. OBTENTION DE PROTÉINES CFTR MODIFIÉES POSSÉDANT DES NBDs INVERSÉS, DÉPLACÉS OU SUPPRIMÉS

Dans le but de préciser *in vivo* le rôle de chaque domaine de liaison aux nucléotides (NBD) dans le repliement et le comportement cellulaire de la protéine CFTR, nous avons choisi de créer des protéines modifiées en supprimant, en déplaçant et/ou en permutant chacun d'entre eux. Pour cela, nous avons privilégié une approche originale : la méthode de Splicing by Overlap Extension (SOE), utilisée pour la première fois par l'équipe de Pease [Horton, R.M. *et al.*, 1989]. La même technique a déjà été utilisée sur des membres de cette superfamille, afin d'obtenir des protéines chimériques SUR1-SUR2A [D'Hahan N. *et al.*, 1999 ; Moreau C. *et al.*, 2000].

Par rapport aux autres techniques utilisées pour modifier des gènes d'intérêt, la SOE présente deux avantages majeurs. D'une part, elle va permettre d'obtenir la grande quantité d'ADN nécessaire au clonage grâce à l'amplification de la séquence obtenue par les différentes étapes de PCR. D'autre part, cette méthode va surtout permettre l'épissage précis de la séquence nucléotidique d'intérêt, sans introduire de matériel supplémentaire ni modifier le reste du gène. Cependant, la performance de la SOE est limitée par la taille du fragment d'ADN à amplifier.

A. DÉFINITION DES FRONTIÈRES DES NBDs

Dans le but de réaliser nos constructions, nous avons d'abord dû définir les limites de chacun des NBDs. Pour délimiter correctement et rigoureusement les frontières de ces domaines, il aurait fallu disposer de la structure tridimensionnelle de CFTR. Or, seules les structures à haute résolution de quatre transporteurs ABC procaryotes sont disponibles. Celle de BtuCD [Locher K.P. *et al.*, 2002], de Sav1866 [Dawson R.J. & Locher K.P., 2006], de HI1470/1 [Pinkett H.W. *et al.*, 2006] et enfin de ModB₂C₂A [Hollenstein K. *et al.*, 2007]. Pour CFTR, la seule structure disponible, obtenue par cristallographie associée à la microscopie électronique, possède une résolution de seulement 2 nm [Rosenberg M.F. *et al.*, 2004], ce qui n'est pas suffisamment précis pour observer une délimitation correcte de chaque domaine. Malgré cela, depuis la découverte du gène *CFTR* par l'équipe de Tsui [Riordan J.R. *et al.*, 1989 ; Rommens J.M. *et al.*, 1989], le débat sur la délimitation des domaines les uns par rapport aux autres est toujours d'actualité, en particulier pour NBD1, du fait de la présence de la F508 dans sa séquence.

Les prédictions de la disposition spatiale de CFTR à partir de sa séquence primaire obtenue après clonage du gène *CFTR* en 1989 définissaient le domaine NBD1 comme étant compris entre les acides aminés **F433** et **I586** et le domaine NBD2 entre les acides aminés **Y1208** et **R1399** [Riordan J.R. *et al.*, 1989]. Expérimentalement, un NBD1 compris entre les acides aminés **F433** et **L633** a tout d'abord été montré comme pouvant restaurer la fonction canal Cl⁻ de CFTR après co-expression avec le reste de la protéine dans l'ovocyte de xénope [Chan K.W. *et al.*, 2000]. Par la suite, Wang et collaborateurs, dans le but d'étudier les interactions entre les différents domaines de CFTR, ont étiqueté et purifié un NBD1 s'étendant de la **D373** à la **S589** [Wang W. *et al.*, 2002]. Une étude phylogénétique *in silico* a quant à elle montré que les limites de ce domaine allaient de la **P439** à la **G646** [Chen J.-M. *et al.*, 2001]. Plus récemment, les structures de NBD1 des CFTR murin et humain ont été déterminées [Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005]. Basés sur une étude pan génomique et sur la solubilité des peptides obtenus pour la cristallographie, les auteurs ont défini NBD1 comme allant du **T389** à la **G673**. Durant la même période, une étude de modélisation avait délimité ce domaine entre les acides aminés **P439** et **G646** [Callebaut I. *et al.*, 2004]. La dernière publication discutant les frontières de NBD1 datait de 2005 et portait sur l'étude des séquences non-conservées de ce domaine. Dans cette étude, NBD1 s'étendait entre les acides aminés **T389** et **M645** [Csanády L. *et al.*, 2005]. Ainsi, la délimitation de la séquence correspondant au NBD1 reste très floue. Pour NBD2, moins étudié, le même problème se pose [Riordan J.R. *et al.*, 1989 ; Chen J.-M. *et al.*, 2001 ; Gentzsch M. *et al.*, 2002 ; Wang W. *et al.*, 2002 ; Callebaut I. *et al.*, 2004].

Dans ce travail, nous nous sommes basés sur la définition d'un domaine NBD d'une protéine ABC pour choisir les limites des domaines NBD1 et NBD2. En effet, un domaine NBD est une région contenant les séquences de Walker A et B, la signature ABC (**LSGGQ**) ainsi que les boucles Q (**Q-loop**), D (**D-loop**) et H (**H-loop**) [Hyde S.C. *et al.*, 1990 ; Moody *et al.*, 2002 ; Smith P.C. *et al.*, 2002]. L'ensemble de nos constructions, réalisées selon cette définition, possède ces éléments, à l'exception de la **H-loop**. En effet, nous avons pris cette décision en nous basant sur deux constatations. D'une part, cette boucle ne semble pas constituer un motif structural aussi conservé que les autres signatures [Smith P.C. *et al.*, 2002 ; Campbell J.D. *et al.*, 2004]. D'autre part, l'histidine centrale de cette boucle n'est pas présente dans le domaine NBD1 de CFTR. Elle y est en effet remplacée par une sérine, suggérant l'absence de nécessité de cette boucle pour l'hydrolyse d'ATP par CFTR. Ainsi définis, notre NBD1 s'étend de la **F433** à l'**I586**, séquence qui englobe la **F508**, et notre NBD2 de la **Y1208** à la **R1399** (**FIGURE R1**).

Résultats

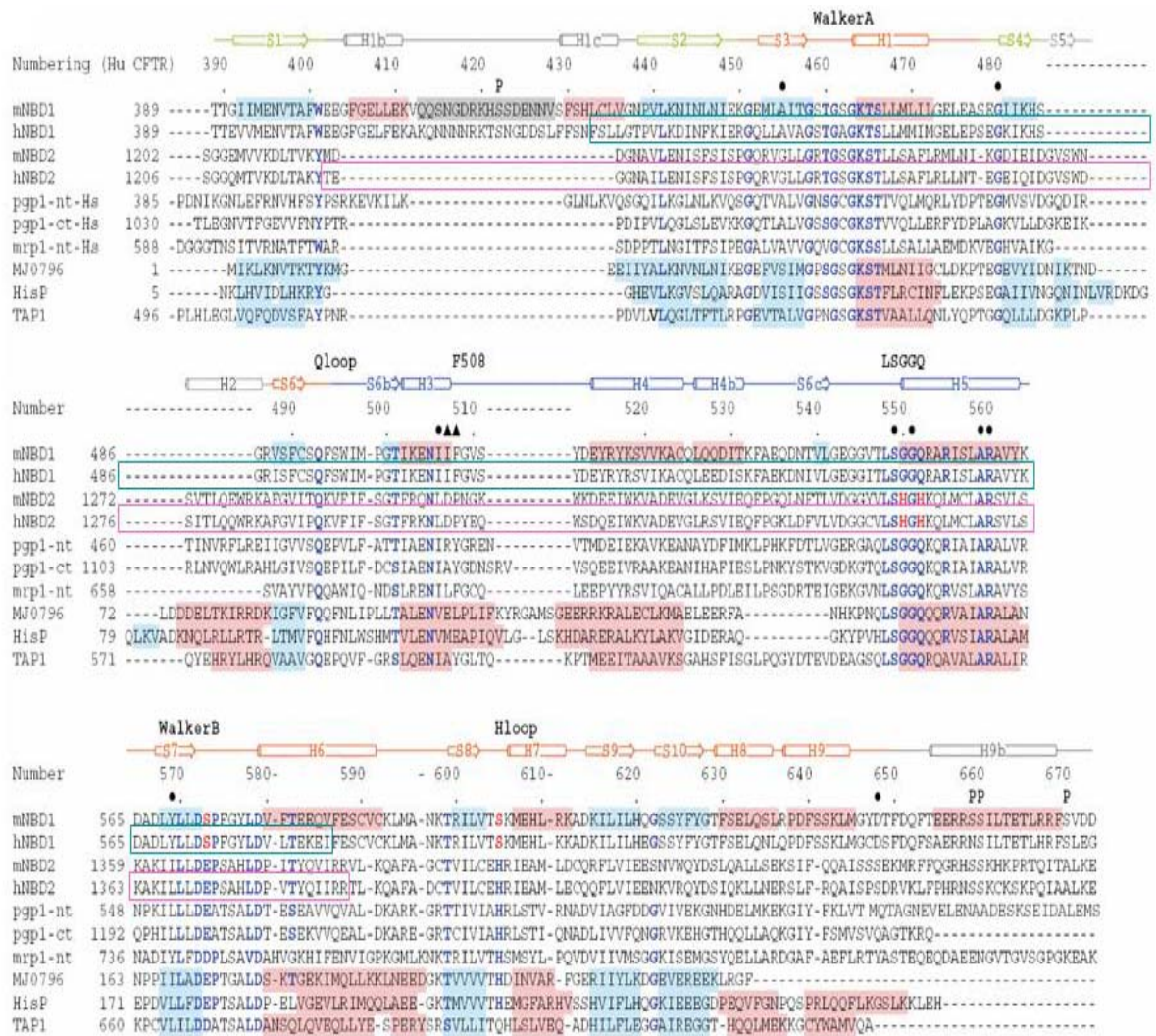


FIGURE R1: Alignement de séquences des domaines NBDs de quelques ABC. La séquence de NBD1 choisie est encadrée en bleu et celle de NBD2 est encadrée en rose. D'après Lewis H.A. *et al.*, 2004.

B. RÉSULTATS DE LA SOE

La délimitation des domaines NBDs nous a ainsi permis de concevoir les oligonucléotides (classiques et hybrides), utilisés pour échanger, déplacer ou supprimer les NBDs de CFTR. Ainsi 13 protéines CFTR différentes ont été créées (**FIGURE R2**). La méthode de SOE ou dite d'«épissage par extension d'amorces hybrides» est basée sur la technique de PCR [Mullis K. *et al.*, 1986 ; Horton, R.M. *et al.*, 1989], et permet la recombinaison de fragments d'ADN de manière précise et spécifique. Décrite en détail dans la partie **Matériel & Méthodes**, la SOE, grâce à ses deux tours de PCR, nous a permis dans un premier temps de créer 5 gènes codant pour 5 protéines différentes : $N_{1/-}$, $N_{1/1}$, $N_{1/1*}$, N_{-2} et $N_{2/2}$ (**FIGURE R2**). Dans 3 de ces protéines, le NBD2 a été soit supprimé ($N_{1/-}$), soit remplacé par NBD1 sauvage ($N_{1/1}$) ou

muté F508del ($N_{1/1}^*$). Pour les 2 autres, le NBD1 a été soit supprimé ($N_{-/2}$) soit remplacé par NBD2 ($N_{2/2}$).

Le reste de nos constructions a été généré par digestion/ligation des 5 gènes obtenus par SOE (**FIGURE R2**).

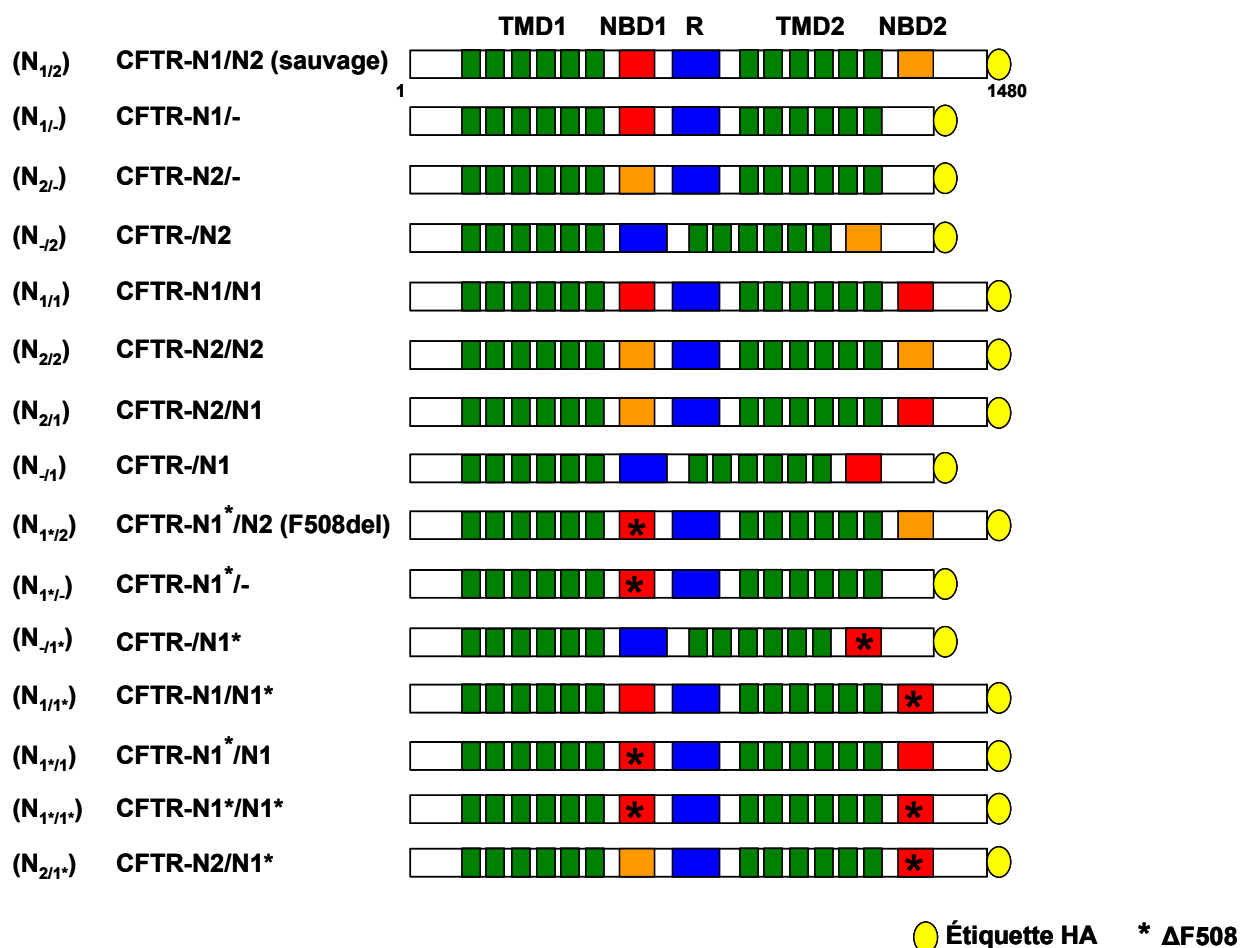


FIGURE R2: Représentation schématique des protéines CFTR modifiées possédant les NBDs inversés, déplacés ou supprimés. Les segments transmembranaires sont colorés en vert, le domaine R en bleu, NBD1 en rouge, NBD2 en orange et l'étiquette hémagglutinine en C-terminale en jaune. Lorsque la F508 est déletée, NBD1 est marqué par une étoile.

1. OBTENTION DES PROTÉINES $N_{1/1}$, $N_{1/1}^*$ et $N_{1/-}$

Pour l'obtention de ces protéines, nous avons utilisé comme matrice de départ l'ADNc (*ADN complémentaire*) codant pour la protéine CFTR flanqué dans sa région 3' d'une séquence codant pour l'étiquette hémagglutinine (HA). Lors du premier tour, 3 réactions de PCR avec des oligonucléotides hybrides ont été réalisées (voir **matériels & méthodes**). La première visait à amplifier la partie du gène située juste avant NBD2, la partie C-terminale de ce fragment étant complémentaire à la partie N-terminale de NBD1 (**FIGURE R3**, colonne 2). La deuxième amplifiait un fragment correspondant au domaine NBD1 lui-même, les

extrémités de ce fragment étant complémentaires des parties situées avant et après NBD2 (**FIGURE R3, colonne 3**). Enfin, la troisième visait à amplifier un fragment correspondant à la partie située juste après NBD2, la partie N-terminale de celui-ci étant complémentaire à la partie C-terminale de NBD1 (**FIGURE R3, colonne 4**). Les 3 séquences d'ADN ainsi amplifiées étaient donc complémentaires à leurs extrémités.

Ces fragments ont par la suite servi d'oligonucléotides pour donner naissance et amplifier un fragment unique d'environ 2,2 kB dont la séquence codant pour NBD1 se trouve entourée des séquences flanquantes de NBD2 (**FIGURE R3, colonne 5**). Après digestion et ligation, nous avons obtenus le gène codant pour la protéine $N_{1/1}$.

Les gènes codant pour les protéines $N_{1/1*}$ et $N_{1/-}$ ont par la suite été générés de la même manière, la seule différence étant que le deuxième fragment obtenu au premier tour de PCR de $N_{1/1*}$ correspondait au NBD1 sans sa **F508** (**FIGURE R3, colonnes 6 à 9**), et qu'il n'existait que 2 fragments, complémentaires à leurs extrémités, pour le premier tour de PCR de $N_{1/-}$, le fragment correspondant au NBD de la réaction normale étant absent (**FIGURE R3, colonnes 10 à 12**).

2. CONSTRUCTION DES PROTÉINES $N_{2/2}$ et $N_{-/2}$

Les protéines CFTR modifiées $N_{2/2}$ et $N_{-/2}$ ont été générées de la même manière que les précédentes. Pour $N_{2/2}$, les deux tours de PCR sont similaires à ceux réalisés pour la construction $N_{1/1}$. Le premier tour de PCR, réalisé avec des oligonucléotides hybrides, permet d'obtenir 3 fragments complémentaires à leurs extrémités (voir **Matériels & Méthodes**) : un premier correspondant à la séquence de la partie située juste avant NBD1, un deuxième correspondant au NBD2 et un troisième correspondant à la séquence de la partie juste après NBD1 (**FIGURE R3, colonnes 13 à 15**). Ces 3 fragments ont ensuite servi d'oligonucléotides pour générer une séquence de 1,8 kB codant pour NBD2 entouré des séquences flanking NBD1 dans le gène sauvage (**FIGURE R3, colonne 16**).

La construction du gène codant pour la protéine $N_{-/2}$ s'est déroulée de manière similaire à celle du gène codant pour la protéine $N_{1/-}$ (**FIGURE R3, colonnes 17 à 19**).

3. LES AUTRES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES

Comme nous l'avons précisé précédemment, 13 constructions codant pour des protéines CFTR modifiées possédant des NBDs inversés, déplacés ou supprimés étiquetés HA en

Résultats

position C-terminale ont été générées (**FIGURE R2**). Sur ces 13 gènes, seulement 5 ont été créés par SOE, et les 7 autres ont été générés à partir des 5 premiers par digestion/ligation.

L'ensemble de nos constructions a été vérifié par digestions enzymatiques et par séquençage.

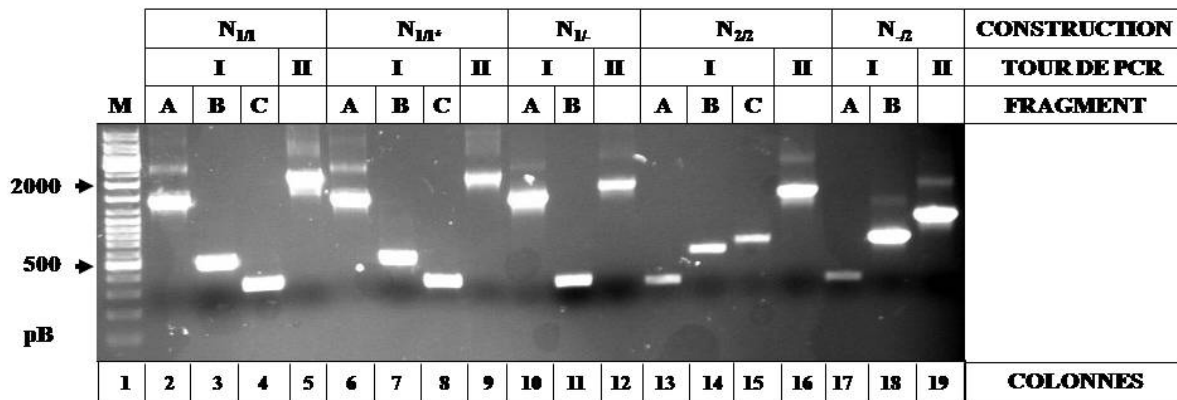


FIGURE R3: Résultats des différents tours de PCR de la méthode de SOE obtenus pour construire les gènes codant les protéines $N_{1/1}$, $N_{1/-}$, $N_{1/1}^*$, $N_{2/2}$ et $N_{2/-}$. Les fragments ont été séparés sur un gel d'agarose à 0,8%. M représente le marqueur de taille.

Par la suite, nous avons choisi de concentrer nos efforts sur 8 constructions parmi les 13 réalisées. Ces constructions possèdent toutes des domaines NBD1 et NBD2 intacts, supprimés, permutés ou remplacés ($N_{2/-}$, $N_{-/1}$, $N_{2/1}$, $N_{1/1}$, $N_{2/2}$, $N_{2/-}$, $N_{1/-}$), sauf une qui ne possède qu'un NBD1 muté F508del ($N_{1*/-}$).

Toutes ces constructions ont été choisies pour essayer de préciser le rôle de chacun des deux domaines, de manière individuelle ou simultanée, dans le comportement cellulaire de CFTR.

II. EXPRESSION BASALE DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer le profil électrophorétique SDS-PAGE basal de nos différentes constructions.

Pour cela, les ADNc codant pour les protéines CFTR modifiées étiquetées HA en position C-terminale ont été transfectés de manière transitoire ou stable dans deux lignées cellulaires COS-7 et BHK-21 respectivement. Le profil d'expression de ces protéines a alors été étudié par immunodétection (western blotting) à l'aide de 3 anticorps monoclonaux : un anticorps anti-HA et deux anticorps anti-CFTR, L12B4 et M3A7 [Kartner N. *et al.*, 1992].

A. TRANSFECTIONS TRANSITOIRES

Dans ces expériences, les gènes codant pour les protéines CFTR sauvage, mutée F508del ainsi que les 8 protéines CFTR modifiées possédant des NBDs inversés, déplacés ou supprimés ont été exprimés de manière transitoire dans les cellules COS-7.

48 heures après la transfection, les protéines ont été extraites, séparées sur gel SDS-PAGE 7% et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Leurs profils d'expression ont alors été révélés par l'utilisation d'anticorps primaires monoclonaux et d'anticorps secondaires couplés à la peroxidase.

Comme attendu, les trois anticorps détectent la protéine CFTR sauvage (wt pour *wild type*) sous ses deux formes. La forme B immature ou core-glycosylée d'environ 140 kDa (flèche vide), et la forme C mature ou complex-glycosylée d'environ 170 kDa (flèche pleine) (**FIGURE R4**). A l'opposé, pour la protéine CFTR-F508del (ΔF), ces anticorps détectent uniquement la forme B immature ou core-glycosylée (**FIGURE R4**). Il s'agit d'une forme caractéristique du RE qui témoigne de la séquestration de CFTR-F508del au niveau de ce compartiment. Ces résultats sont conformes à ceux observés dans la littérature [Cheng S.H. *et al.*, 1990 ; Gregory R.J. *et al.*, 1990].

Concernant les protéines CFTR modifiées, la première observation que nous avons pu réaliser est que malgré les modifications drastiques apportées au gène *CFTR* par l'inversion, le déplacement ou la suppression des séquences codant les NBDs, celles-ci sont correctement exprimées. En effet, toutes les constructions ont été détectées par les anticorps anti-HA et anti-CFTR (L12B4 et M3A7) (**FIGURE R4**). Une différence dans la migration des protéines ne possédant qu'un seul NBD et celles en possédant deux a cependant été observée. En effet, la suppression de NBD1 ou de NBD2 entraîne la perte d'environ 20 kDa, ce qui explique les différences de taille observées pour ces protéines après migration sur gel SDS-PAGE (**FIGURE R4**).

Quant à l'expression des ces différentes protéines, les résultats observés sont différents selon les constructions. Pour la majorité d'entre elles, $N_{2/2}$, $N_{-/2}$, $N_{2/1}$, $N_{2/-}$, $N_{-/1}$, $N_{1/1}$ et $N_{1*/-}$, seule la forme B immature de la protéine est détectable, suggérant que celles-ci sont séquestrées au niveau du RE, et donc incapables d'atteindre la forme complex-glycosylée (**FIGURE R4**). Par contre, la protéine $N_{1/-}$, qui ne possède pas de NBD2, est présente à la fois sous les formes core- et complex-glycosylées (**FIGURE R4**). $N_{1/-}$ est donc la seule protéine modifiée capable d'atteindre la forme mature.

Ainsi, NBD2 ne semble pas être nécessaire à la maturation de CFTR. NBD1, quant à lui, semble l'être puisque les protéines modifiées ne le possédant pas sont incapables de maturer. Cependant, pour qu'il y ait maturation de la protéine, ce domaine NBD1 doit être à sa position initiale, puisque $N_{-/1}$ ne mature pas (**FIGURE R4**), et doit être intact, puisque si la mutation F508del est introduite dans $N_{1/-}$ ($N_{1*/-}$) il n'y a pas de maturation non plus (**FIGURE R4**).

En outre, bien que NBD1 soit intact et présent en première position, la substitution de NBD2 par un autre NBD1 (présence de deux domaines homologues à 100%) pour donner $N_{1/1}$, génère une protéine exprimée uniquement sous sa forme immature, et donc séquestrée au niveau du RE (**FIGURE R4**). D'une manière générale, on constate que la présence de NBD2 n'est pas nécessaire pour l'étape de maturation. Cependant, la présence d'un autre NBD, bien qu'homologue à 100% à NBD1, déstabilise le processus de maturation de CFTR.

Les résultats obtenus après utilisation de l'anticorps L12B4, généré contre le peptide immunogène compris entre les acides aminés 386 et 412, juste avant le domaine NBD1 [Kartner N. *et al.*, 1992] et l'anticorps anti-HA dont l'épitope est localisé dans la partie non modifiée de CFTR (partie C-terminale) sont semblables et confirment que les caractéristiques particulières observées pour chacune des protéines modifiées sont bien dues à l'inversion ou à la suppression d'un NBD et non pas à un artéfact inhérent à l'utilisation de l'étiquette HA.

De plus, l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-CFTR M3A7, dont l'épitope est compris entre les acides aminés 1365 et 1395, à cheval entre NBD2 et la partie C-terminale de CFTR [Kartner N. *et al.*, 1992], nous a permis de confirmer les suppressions ou les remplacements du domaine NBD2 dans nos différentes constructions. En effet, l'anticorps M3A7 détecte les protéines possédant le domaine NBD2 à sa position correcte (wt, ΔF , $N_{2/2}$ et $N_{-/2}$), mais pas celles dans lesquelles NBD2 a été supprimé ($N_{-/1}$, $N_{1*/-}$, $N_{1/1}$ et $N_{1/-}$) ou déplacé ($N_{2/1}$ et $N_{2/-}$).

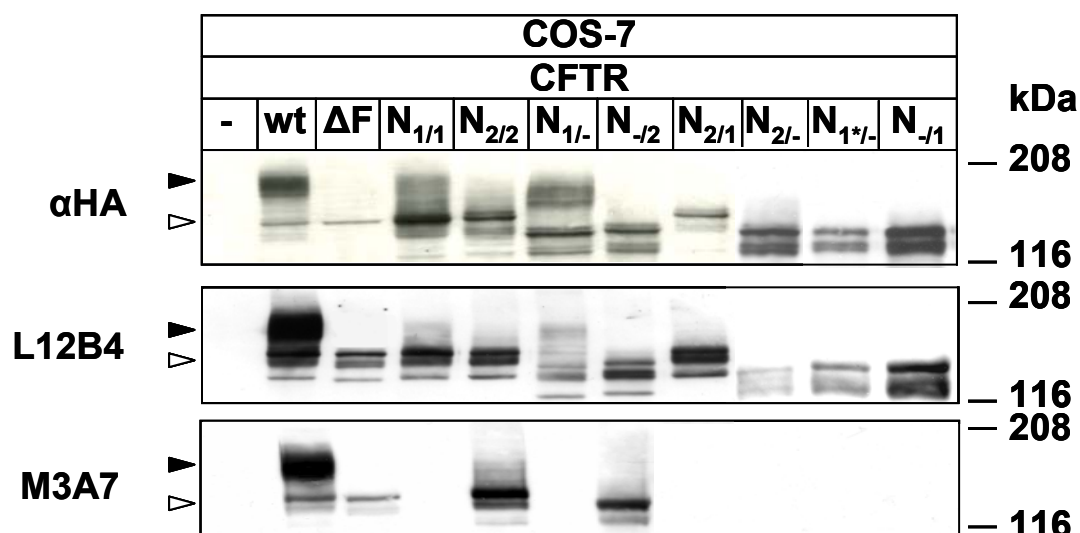


FIGURE R4: Expression basale des protéines CFTR sauvage (wt), F508del (ΔF) et modifiées extraites de cellules COS-7 où elles sont exprimées transitoirement. Le profil électrophorétique a été déterminé par immunodétection en utilisant les anticorps anti-HA et anti-CFTR L12B4 et M3A7. La flèche vide représente la forme immature core-glycosylée et la flèche pleine la forme mature complex-glycosylée.

B. TRANSFECTIONS STABLES

Par la suite, dans le but de réaliser des études biochimiques, fonctionnelles et du comportement cellulaire de CFTR, nous avons choisi de ne travailler qu'avec des lignées cellulaires exprimant stablement nos différentes constructions. Ce choix était surtout dicté par le gain en temps. En effet une expression transitoire n'est expérimentalement utilisable qu'au bout de 48 h et ne l'est plus après 72 h. La lignée cellulaire parentale que nous avons utilisée pour générer l'ensemble de nos lignées était BHK-21.

Pour générer ces différentes lignées cellulaires, nous avons tout d'abord transféré les gènes codant pour les protéines CFTR modifiées dans un autre vecteur d'expression que pcDNA3.1, le vecteur pNUT, déjà utilisé pour exprimer CFTR sauvage et muté [Haardt M. *et al.*, 1999]. Nous avons envisagé cette stratégie car avec le vecteur pcDNA3.1, après transfection et sélection au G418, nous avons obtenu des lignées cellulaires comportant de nombreux clones faux-positifs n'exprimant que peu ou pas nos protéines, même après clonage par dilution. Avec le vecteur pNUT, 48 h après la transfection au phosphate de calcium, les cellules ont été sélectionnées par 500 μM de méthotrexate, son agent de sélection, et 2 semaines plus tard, des clones positifs ont été repiqués et le mélange de ces clones a été amplifié.

Pour vérifier, le plus rapidement possible, le niveau ainsi que le degré d'expression dans les cellules BHK-21 de nos différentes constructions stablement transfectées, nous avons

Résultats

réalisé une immunofluorodétection à l'aide de l'anticorps anti-HA et d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les résultats obtenus, présentés sur la **FIGURE R5**, montrent que par rapport aux protéines CFTR sauvage (wt) et mutée F508del (ΔF), environ 100% des cellules ainsi obtenues expriment nos différentes constructions. Cependant le niveau d'expression est différent d'une lignée à une autre. Ces résultats confirment ceux de l'immunodétection (**FIGURE R4**) à savoir que la suppression, la permutation ou le remplacement des domaines NBD1 et NBD2 ne perturbe pas la synthèse de la protéine CFTR.

Ainsi, l'utilisation du plasmide pNUT nous a permis d'obtenir des mélanges de cellules exprimant toutes nos constructions sans perte de signal après plusieurs passages. Ces lignées cellulaires ont par la suite été utilisées pour réaliser nos différentes expérimentations, sauf indication contraire.

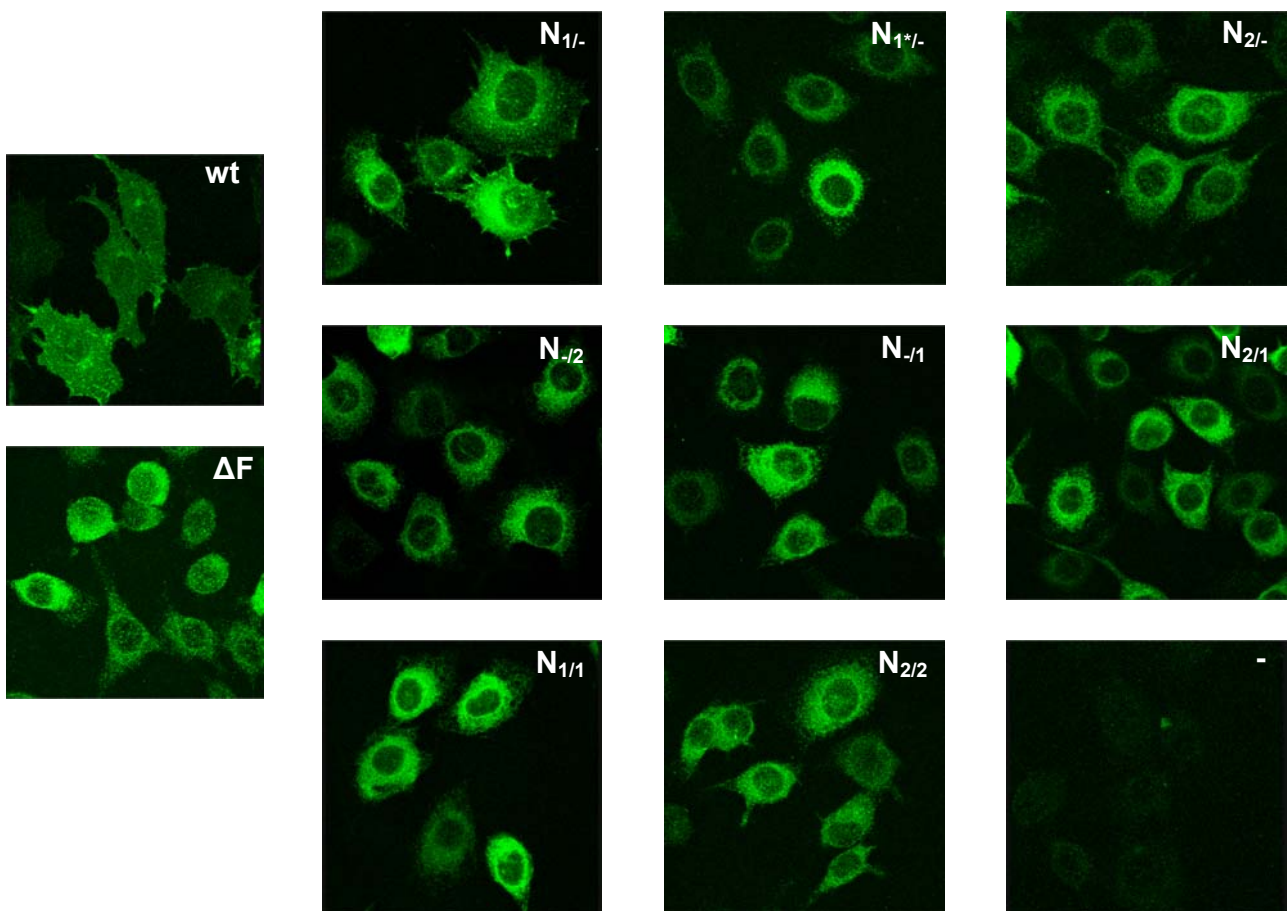


FIGURE R5: Immunofluorodétection des protéines CFTR sauvage (wt), F508del (ΔF) et modifiées stablement exprimées dans les cellules BHK-21. L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps monoclonal anti-HA et l'anticorps secondaire est un anti-souris couplé à l'Alexa-488. Les images ont été prises au microscope confocal à l'aide d'un objectif 63 \times à immersion à huile avec un système Leica TCS SP2 et le logiciel Leica confocal software (Leica, France).

Résultats

Par la suite nous avons cherché à comparer l'expression basale de ces protéines à celle obtenue après leur transfection transitoire dans la lignée cellulaire COS7. Par immunodétection en utilisant les anticorps anti-HA et anti-CFTR (L12B4 et M3A7), nous avons observé le même profil électrophorétique (**FIGURE R6**).

A travers ces résultats, nous avons confirmé que le domaine NBD1, sa position dans la séquence primaire de CFTR ainsi que la présence de la F508 sont très importants pour la maturation de CFTR.

L'ensemble de nos données montre aussi que le profil d'expression des différentes constructions est la conséquence de leurs propriétés intrinsèques, et qu'il n'est influencé ni par le type de plasmide, ni par la lignée cellulaire ni par le mode de transfection utilisés.

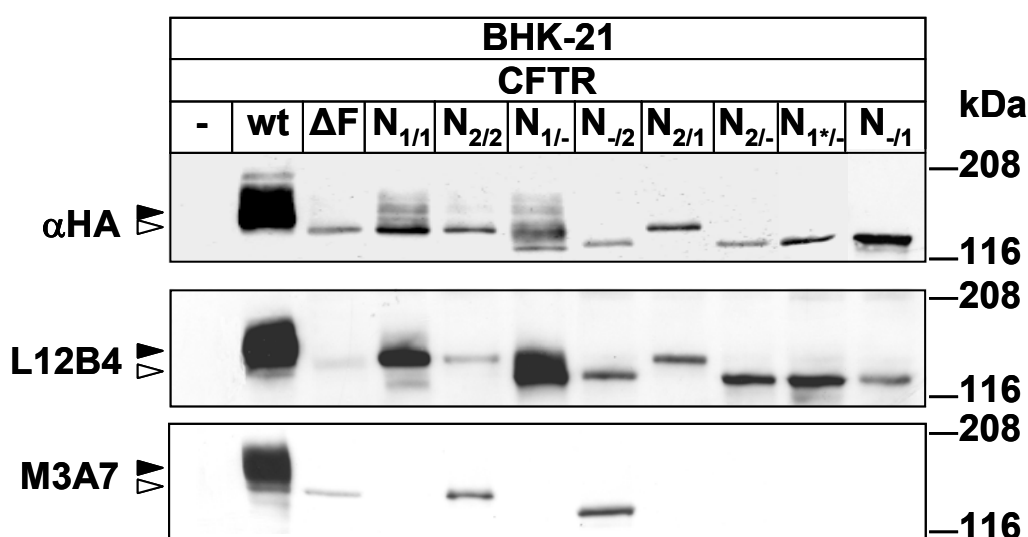


FIGURE R6: Expression basale des protéines CFTR sauvage (wt), F508del (ΔF) et modifiées stablement exprimées dans les cellules BHK-21. Le profil électrophorétique a été déterminé par immunodétection en utilisant les anticorps anti-HA et anti-CFTR (L12B4 et M3A7). La flèche vide représente la forme B immature core-glycosylée et la flèche pleine la forme C mature complex-glycosylée.

III. GLYCOSYLATION DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES

Le processus de maturation de CFTR correspond à une glycosylation réalisée en deux étapes sur les deux asparagines en position 894 et 900, localisées au niveau de la boucle extracellulaire 4 de CFTR (ECL4) [Cheng S.H. *et al.*, 1990 ; Gregory R.J. *et al.*, 1990]. La première étape est une N-glycosylation ayant lieu dans le RE de manière co-translationnelle et va donner la forme immature appelée core-glycosylée ou forme B [Lukacs G.L. *et al.*, 1994]. La seconde étape résulte d'une modification de la chaîne oligosaccharidique au niveau de l'appareil de Golgi. Cette dernière n'est plus riche en mannoses mais en glucides complexes,

ce qui va alors donner une forme mature appelée complex-glycosylée ou forme C [Lukacs G.L. *et al.*, 1994]. En utilisant deux glycosidases, l'Endoglycosidase H (EndoH) et la Peptide N-Glycanase F (PNGase F), il est possible de distinguer les formes B et C, et ainsi d'évaluer le niveau de maturation de la protéine. En effet, la forme B est sensible à la fois à l'EndoH et à la PNGase F alors que la forme C n'est sensible qu'à la PNGase F [Ward C.L. & Kopito R.R., 1994].

Nous avons donc utilisé ce procédé pour confirmer que certaines de nos protéines CFTR modifiées étaient capables de maturer. Les différentes protéines, exprimées de manière stable dans les cellules BHK-21 ont été extraites, digérées par l'EndoH et la PNGase F, puis leur profil respectif de migration a été révélé par l'anticorps anti-HA.

Ces profils ont été comparés à ceux de la protéine sauvage (CFTR) et mutée F508del (Δ F508). Concernant la protéine sauvage, lorsque celle-ci est digérée par l'EndoH, nous pouvons observer que la forme immature subit une perte de poids moléculaire par rapport à la protéine non digérée, due à l'élimination de la partie glycosylée. Par contre la forme mature n'est pas sensible à ce traitement (**FIGURE R7**). Cependant, lorsque cette protéine est digérée par la PNGase F, ce sont à la fois les formes immature et mature qui subissent une modification de leur poids moléculaire due à la perte de la partie glycosylée (**FIGURE R7**). Pour la protéine CFTR-F508del (Δ F508), les profils de digestion par les enzymes EndoH et PNGase F sont identiques. Dans les deux cas, il y a accumulation de la protéine sous une forme non-glycosylée (**FIGURE R7**). Ces résultats sont en complète adéquation avec les études réalisées précédemment [Lukacs G.L. *et al.*, 1994 ; Ward C.L. & Kopito R.R., 1994].

La majorité des protéines CFTR modifiées présente un profil comparable à celui de la protéine CFTR-F508del, confirmant ainsi qu'elles ne sont pas capables de quitter le RE pour être complex-glycosylées. Cependant, la construction N_{1/} a un profil similaire à celui de la protéine sauvage (**FIGURE R7**). Ceci confirme que cette protéine modifiée possède une forme glycosylée complexe. La suppression du domaine NBD2 n'empêche donc pas le processus de glycosylation nécessaire à la maturation de CFTR.

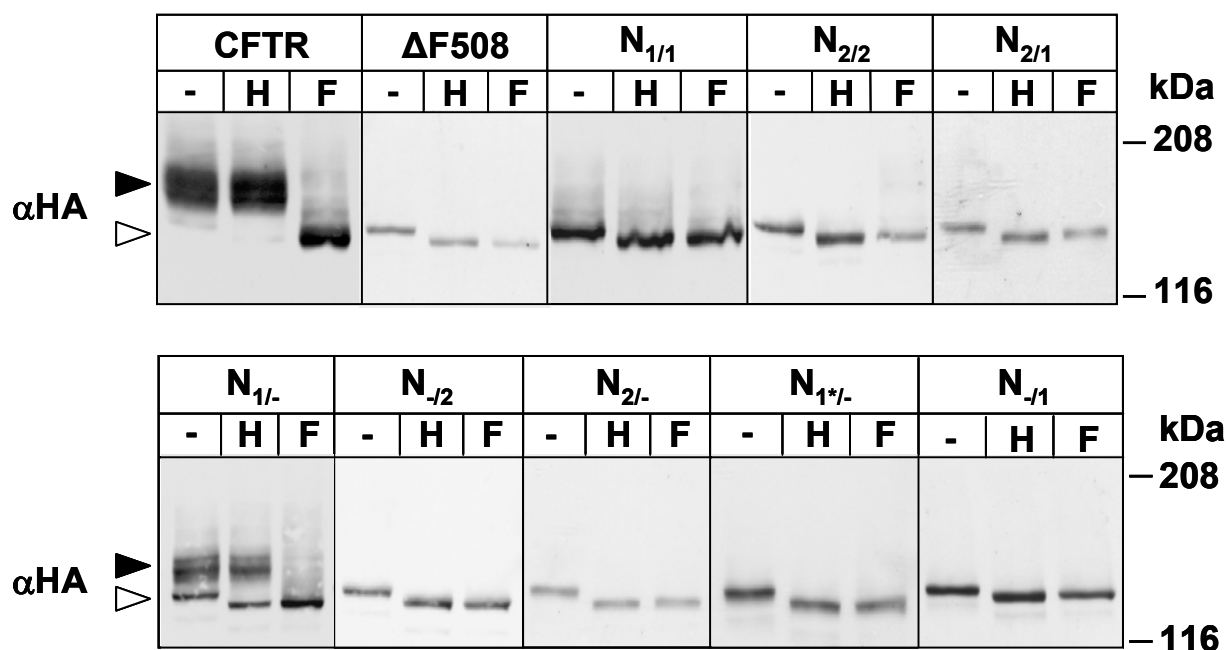


FIGURE R7: Profil de glycosylation des protéines CFTR sauvage (CFTR), mutée F508del (Δ F508) et modifiées étudié après digestions à l'endoH et à la PNGase F. (–) représente les protéines non digérées, (H) les protéines digérées à l'endoH et (F) les protéines digérées à la PNGase F. La flèche vide correspond à la forme core-glycosylée et la flèche pleine à la forme complex-glycosylée.

Des résultats similaires ont été obtenus avec les même constructions mais exprimées transitoirement dans les cellules COS-7 (résultats non présentés), confirmant ainsi que les observations réalisées ne sont dues ni aux plasmides, ni au modèle cellulaire, ni au mode de transfection utilisés, mais bien aux propriétés intrinsèques de nos protéines.

IV. LOCALISATION DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES

La protéine CFTR est un canal chlorure situé à la membrane apicale des cellules épithéliales. En présence de la mutation F508del, ce canal reste séquestré dans le RE où il est rapidement dégradé [Cheng S.H. *et al.*, 1990 ; Yang Y. *et al.*, 1993 ; Lukacs G.L. *et al.*, 1994 ; Ward C.L. & Kopito R.R., 1994]. La mise en évidence, par immunodétection et par déglycosylation, des différentes formes de CFTR n'est pas une preuve irréfutable de sa localisation membranaire. En effet, il a été montré que la protéine CFTR sauvage est localisée au niveau du RE, à la membrane plasmique ainsi que dans des compartiments pseudo-membranaires encore mal identifiés [Denning G.M. *et al.*, 1992b ; Lukacs G.L. *et al.*, 1992 ; Biwersi J. & Verkman A.S., 1994]. La protéine CFTR-F508del, quant à elle, est localisée majoritairement au niveau du RE, avec cependant des fuites vers des compartiments pseudo-

membranaires voir même vers la membrane plasmique [Ward C.L. & Kopito R.R., 1994 ; Gilbert A. *et al.*, 1998 ; Kälén N. *et al.*, 1999].

Ainsi, pour déterminer la localisation cellulaire de nos protéines CFTR modifiées par rapport à celle de la protéine CFTR sauvage (wt) et mutée F508del (ΔF), nous avons réalisé des expériences d'immunolocalisation sur cellules fixées et perméabilisées à l'aide de l'anticorps anti-HA et d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488. Les compartiments des cellules COS-7 étant plus distinguables, les expériences ont été réalisées sur ces cellules transitoirement transfectées par l'ensemble des constructions, y compris CFTR sauvage et muté F508del.

Les résultats présentés sur la **FIGURE R8** montrent que la protéine sauvage (wt) est localisée au niveau de la membrane plasmique, alors que la protéine mutée F508del (ΔF) est localisée uniquement au niveau du RE. En ce qui concerne nos constructions, elles présentent toutes une localisation typiquement RE comparable à celle de CFTR-F508del, à l'exception de la protéine $N_{1/-}$ (**FIGURE R8**). Cette dernière est en effet présente à la membrane plasmique, tout comme la protéine sauvage (**FIGURE R8**). Il est aussi important de noter que l'introduction de la mutation F508del dans la protéine $N_{1/-}$ ($N_{1*/-}$) abolit le trafic vers la membrane plasmique au même titre que le positionnement du NBD1 à la place du NBD2 ($N_{1/1}$) (**FIGURE R8**). Ces résultats indiquent donc que la présence d'un NBD1 intact dans sa position d'origine est nécessaire à l'adressage et à l'expression de CFTR au niveau de la membrane plasmique.

Résultats

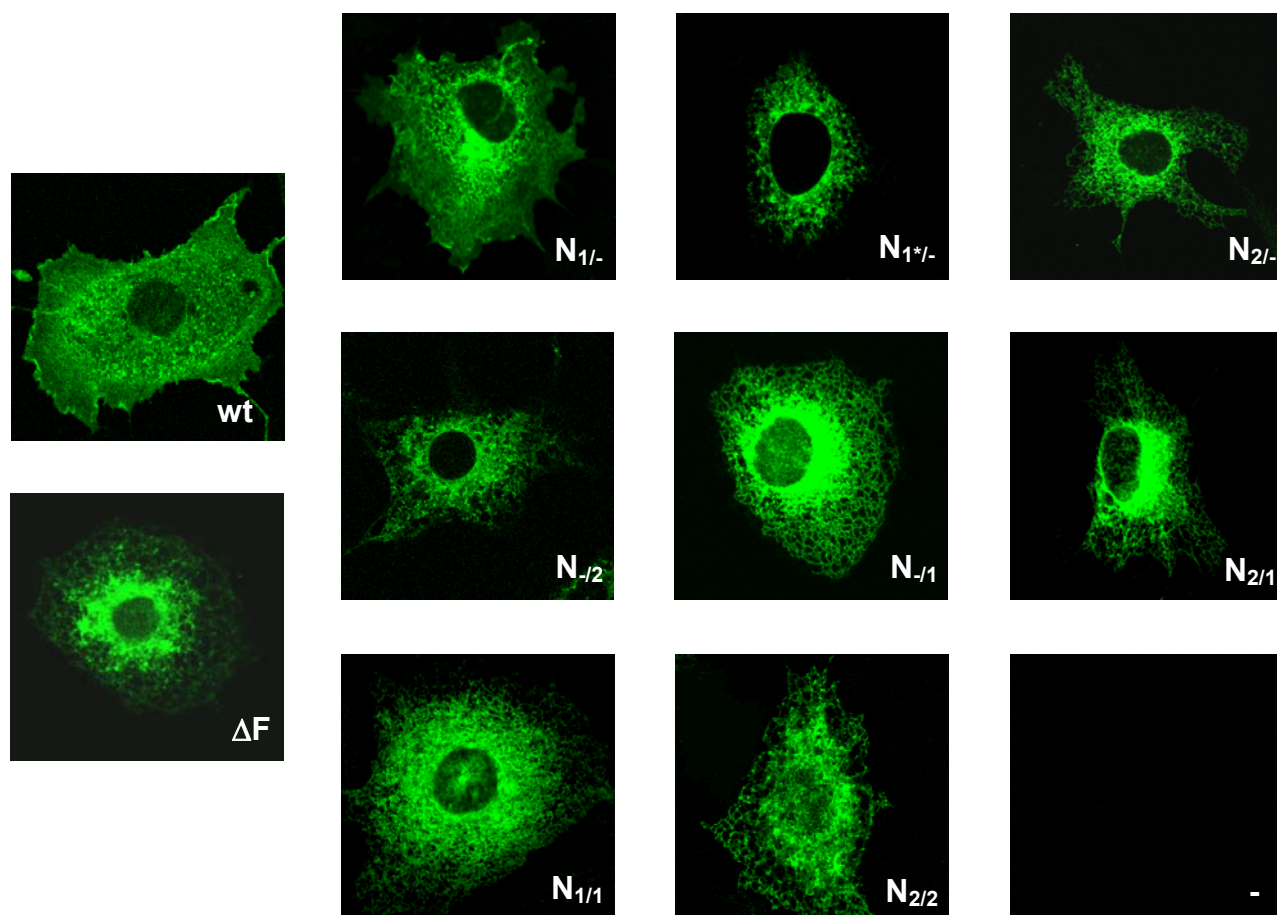


FIGURE R8: Localisation intracellulaire des protéines CFTR (WT), sauvage, F508del (ΔF) et modifiées, exprimées transitoirement dans les cellules COS-7. L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps monoclonal anti-HA et l'anticorps secondaire est un anti-souris couplé à l'Alexa-488. Les images ont été prises au microscope confocal à l'aide d'un objectif 63 \times à immersion à huile avec un système Leica TCS SP2 et le logiciel Leica confocal software (Leica, France).

Cependant, ces expériences d'immunolocalisation ont été réalisées sur des cellules perméabilisées. Or la localisation RE, très caractéristique de CFTR, peut rendre difficile l'appréciation de la localisation membranaire. Afin de s'affranchir de ce phénomène, nous avons réalisé des expériences d'immunolocalisation sur des cellules COS-7 fixées mais non perméabilisées. L'immunolocalisation a été obtenue à l'aide d'un anticorps primaire reconnaissant la 1^{ère} boucle extracellulaire de CFTR (ECL1) et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488. Les résultats ainsi obtenus confirment que la protéine $N_{1/-}$, comme la protéine CFTR sauvage (wt), est bien exprimée au niveau de la membrane plasmique, alors que la protéine mutée F508del est peu ou pas du tout localisée à la membrane plasmique (**FIGURE R9**).

Résultats

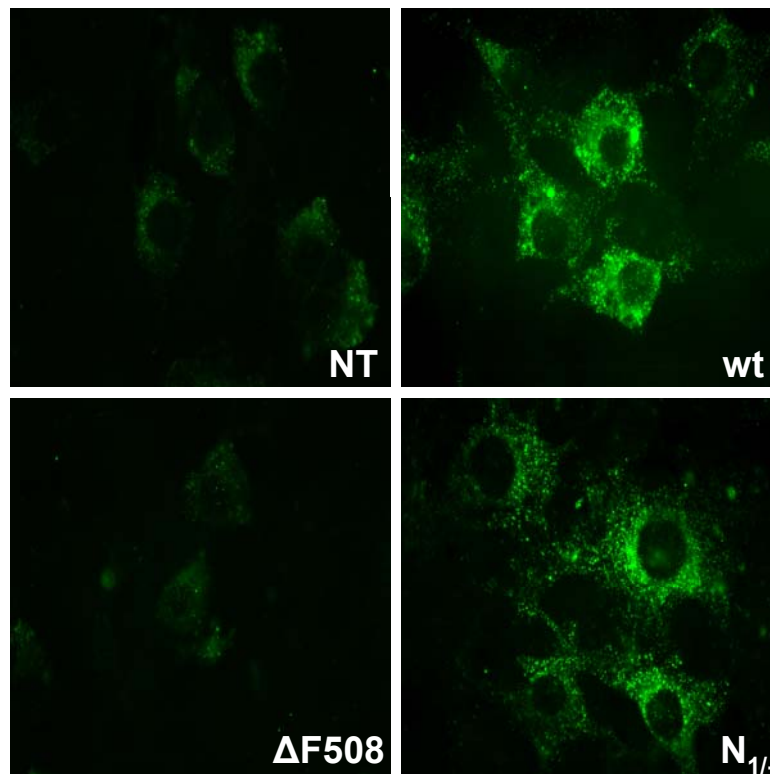


FIGURE R9: Localisation des protéines CFTR sauvages (wt), F508del (Δ F508del) ou $N_{1/-}$ exprimées transitoirement dans les cellules COS-7 (NT désigne des cellules non transfectées). La réaction anticorps-antigène a été réalisée sur des cellules fixées et non perméabilisées. L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps monoclonal dirigé contre la 1^{ère} boucle extracellulaire de CFTR (ECL1) et l'anticorps secondaire est un anti-souris couplé à l'Alexa-488. Les images ont été prises au microscope confocal à l'aide d'un objectif 63 \times à immersion à huile avec un système Leica TCS SP2 et le logiciel Leica confocal software (Leica, France).

V. LES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES LIENT L'ATP

Dans les transporteurs ABC, le rôle principal des NBDs est de lier et d'hydrolyser l'ATP [Higgins C.F., 1992]. Dans la protéine CFTR, les domaines NBD1 et NBD2 lient l'ATP avec une affinité très différente et l'hydrolysent à des vitesses variables [Aleksandrov L. *et al.*, 2001 & 2002]. Ces observations peuvent être la résultante de différences structurales entre les domaines, mais peuvent aussi être la conséquence de l'influence mutuelle que chaque domaine peut exercer sur l'autre [Kidd J.F. *et al.*, 2004]. Nous avons donc voulu vérifier si nos différentes constructions liaient toujours l'ATP en dépit des modifications apportées. Pour cela, nous avons évalué leur capacité à se fixer sur une colonne d'ATP-agarose et nous avons comparé celle-ci à celle des protéines CFTR sauvages (wt) et F508del (Δ F). Après fixation sur la colonne d'ATP-agarose, lavage et élution avec du LSB 2X, l'éluat a été séparé sur gel d'acrylamide à 7% et électrotransféré sur membrane de nitrocellulose. Les protéines CFTR ont par la suite été immunodétectées à l'aide de l'anticorps anti-HA.

Résultats

Les résultats présentés sur la **FIGURE R10** montrent que l'ensemble de nos constructions lie l'ATP. Cependant, par rapport à la protéine sauvage, l'affinité de cette liaison à l'ATP est très différente selon la construction. Cette différence semble être dépendante de la position de chacun des deux NBDs (**FIGURE R10**).

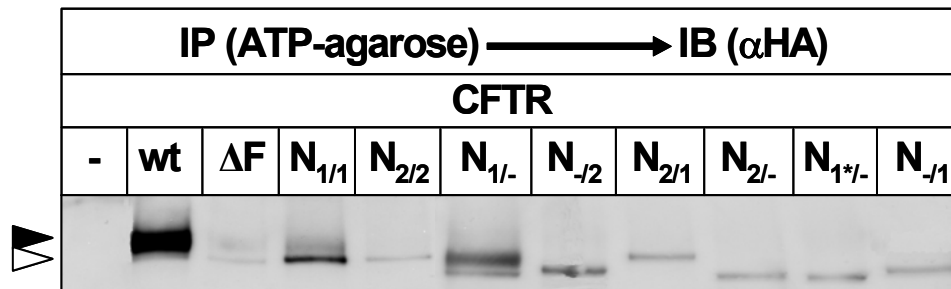


FIGURE R10: Liaison à l'ATP des protéines CFTR sauvage (wt), F508del (ΔF) et modifiées, stablement exprimées dans les cellules BHK-21. Les protéines extraites ont été précipitées avec de l'ATP-agarose. Après élution avec LSB2x, les protéines d'intérêt ont été séparées sur gel SDS-Page 7%, électrotransférées et révélées par immunodétection avec l'anticorps anti-HA, un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

Ces résultats montrent aussi que malgré les modifications apportées, nos protéines CFTR modifiées gardent potentiellement leur capacité à hydrolyser l'ATP, et donc probablement la capacité à transporter les ions Cl⁻.

VI. FONCTION DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES

Après avoir vérifié que nos différentes constructions étaient capables de lier l'ATP, et donc potentiellement de transporter des ions Cl⁻ à travers la membrane plasmique, nous avons voulu vérifier si la fonction canal chlorure de ces protéines était altérée par les modifications apportées. Cependant, nous avons démontré précédemment que seule N_{1/-} est capable d'atteindre la membrane plasmique. La détection d'un transport ionique pour cette protéine était donc attendue. Pour les autres constructions, nous avons essayé de mesurer ce transport afin de confirmer que celles-ci sont bien séquestrées dans le RE et qu'il n'existe pas de fuite.

Pour étudier la fonction des protéines CFTR modifiées, deux techniques ont été utilisées. La technique d'efflux d'iodures et la technique de patch-clamp sur cellules entières.

A. ÉTUDE PAR MESURE DE L'EFFLUX D'IODURES

La première technique utilisée pour mesurer le transport transmembranaire d'ions spécifique au canal CFTR a été la technique de mesure de l'efflux d'iodures. Cette technique

Résultats

est en effet très utilisée pour apprécier la fonction canal Cl^- de CFTR, et particulièrement pour évaluer les effets de mutations ponctuelles ou de drogues sur le canal [Venglarik C.J. *et al.*, 1990, Chang X.-B. *et al.*, 1993 ; Pollet J.-F. *et al.*, 1997 ; Norez C. *et al.*, 2006 ; Wang Y. *et al.*, 2007].

Pour cela, les cellules BHK-21 transfectées de manière stable sont tout d'abord chargées en iodures, puis le relargage AMPc-dépendant de ces ions dans le milieu extérieur est mesuré. 1min après l'ajout dans le milieu d'IMBX (inhibiteur de phosphodiesterases) et de Forskoline (stimulateur de la production de l'AMPc par l'adénylate cylase), un pic maximal de relargage d'iodures est détecté dans les cellules exprimant la protéine sauvage (wt). Ce phénomène n'est pas observé lorsque ces cellules ne sont pas stimulées ou expriment la protéine CFTR-F508del (ΔF) (**FIGURE R11**). Ces résultats sont conformes à ceux retrouvés dans la littérature [Sharma M. *et al.*, 2001], et montrent que la détection d'un transport d'ions à la membrane plasmique pourrait aussi nous permettre de confirmer la localisation membranaire de CFTR.

En ce qui concerne nos protéines CFTR modifiées, aucune activité n'a été observée (**FIGURES R11**). Pour la majorité de ces constructions, ce résultat était prévisible, celles-ci étant séquestrées au niveau du RE. Par contre, à notre grande surprise, aucun efflux d'iodures n'a été détecté pour la protéine $\text{N}_{1/-}$, alors que celle-ci est capable d'atteindre la membrane plasmique (**FIGURES R11**). L'analyse de pic de stimulation confirme ces résultats et montre que seule la protéine CFTR sauvage est capable de répondre à la stimulation AMPcyclique (**FIGURES R12**).

Résultats

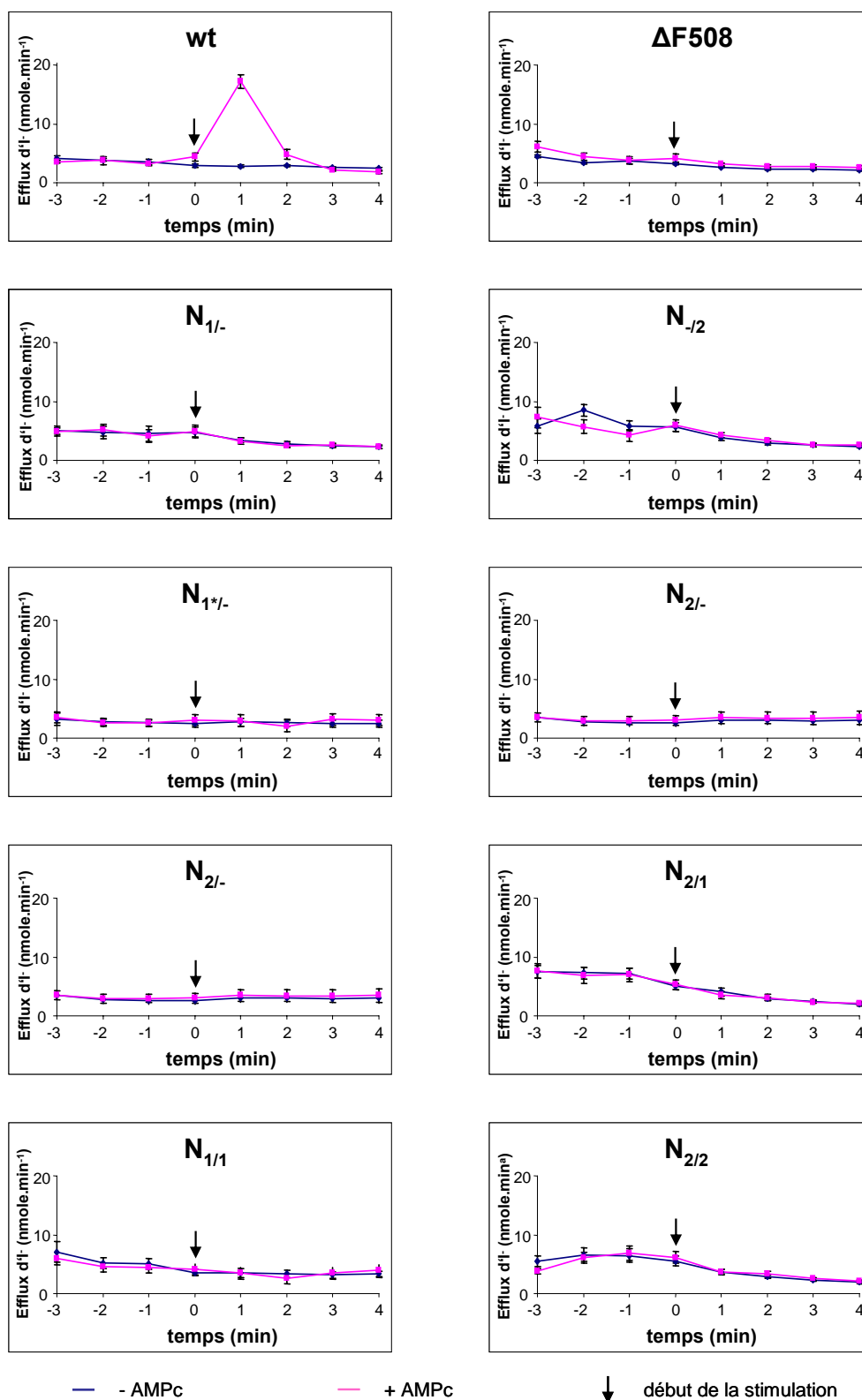


FIGURE R11: Représentation graphique de l'expérience de mesure de l'efflux d'iodures en fonction du temps réalisée sur les cellules BHK-21 exprimant de manière stable les protéines CFTR sauvage (wt), mutée ($\Delta F508$) et modifiées. Dans tous les cas, la courbe bleue représente l'efflux de cellules non stimulées, et la courbe rose l'efflux des cellules après stimulation. La flèche noire représente le temps (0min) de début de stimulation à l'AMPc (n = 4).

Résultats

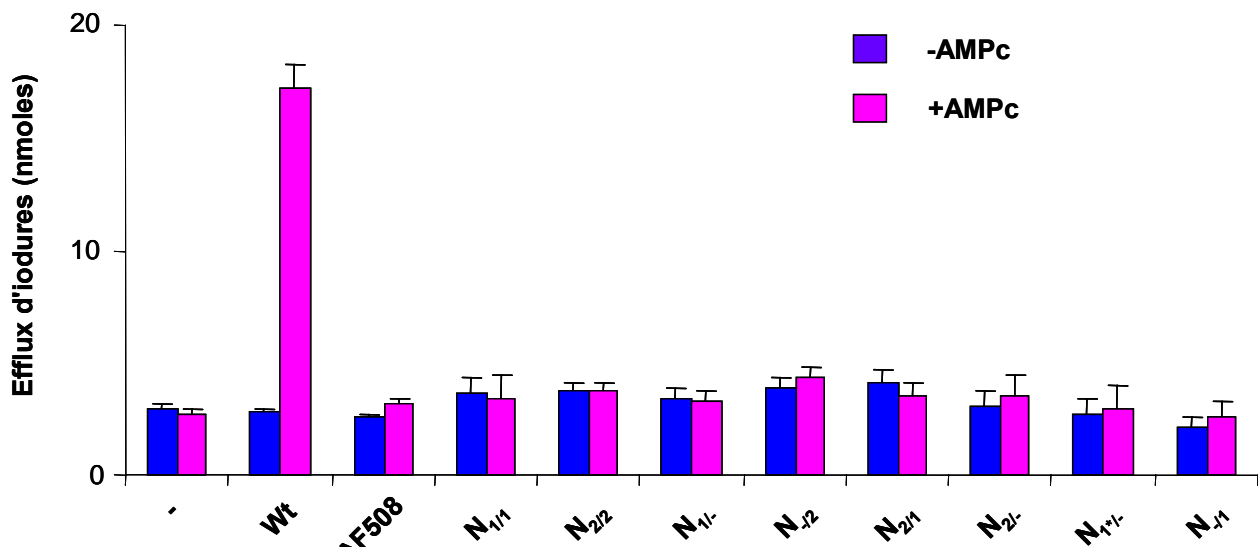


FIGURE R12: Graphique représentant le pic d'excrétion d'iodures, une minute après le début de la stimulation par l'AMPc, par les cellules BHK-21 exprimant stablement les protéines CFTR sauvage (wt), F508del ($\Delta F508$) et modifiées.

Cependant, la technique d'efflux d'iodures possède un désavantage majeur lié à sa limite de détection. En effet, il est possible que si la protéine n'est présente qu'en très faible quantité à la membrane plasmique (par exemple $N_{1/-}$), le transport d'ions ne soit pas détecté. Pour vérifier cette possibilité, nous avons fait appel à une technique beaucoup plus sensible, la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.

B. ÉTUDE PAR PATCH-CLAMP

Dans le but de caractériser la fonction de CFTR de manière beaucoup plus sensible, la technique de patch-clamp en configuration cellule entière a été utilisée. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire du Dr. Marc Chanson (Laboratoire d'Investigations Cliniques, Université de Genève, Genève, Suisse). Les résultats obtenus confirment ceux observés avec la technique de mesure de l'efflux d'iodures, c'est-à-dire que contrairement à la protéine sauvage, aucune de nos protéines CFTR modifiées n'est fonctionnelle, y compris $N_{1/-}$, pourtant présente à la membrane (**FIGURE R13**).

Ainsi, par deux techniques différentes, l'efflux d'iodures et le patch-clamp en configuration cellule entière, nous avons montré que, malgré le fait qu'il ne soit pas nécessaire à la maturation et à l'adressage de CFTR, NBD2 est nécessaire à la fonction du canal.

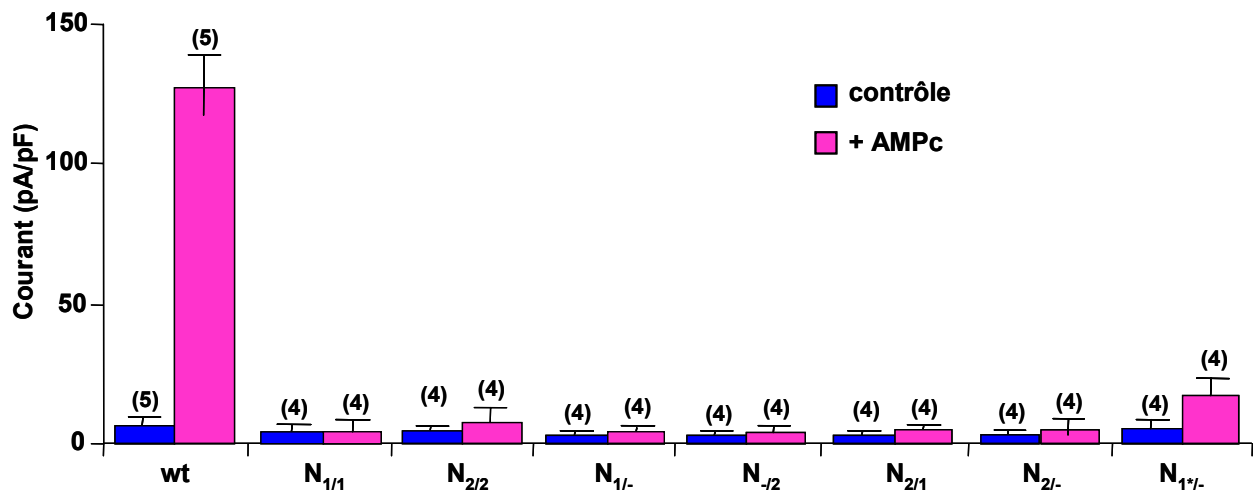


FIGURE R13 : Graphique représentant la stimulation d'un courant Cl⁻ (pA) par l'AMP cyclique (AMPc) normalisé par rapport à la taille (capacitance, pF) des cellules patchées. Les cellules BHK-21 exprimant de manière stable les protéines CFTR sauvage (wt) et modifiées ont été patchées en configuration cellule entière.

VII. BIOSYNTHÈSE DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES

Pour obtenir nos constructions, nous avons supprimé, déplacé et/ou inversé les domaines NBD1 et NBD2 par la méthode SOE. Or, ces modifications peuvent introduire des changements dans le gène *CFTR* qui peuvent influencer sa transcription, la stabilité de son ARNm et/ou sa traduction. En effet, parmi les 1556 mutations recensées à ce jour sur le gène *CFTR*, certaines entraînent un défaut de biosynthèse de la protéine CFTR en altérant la stabilité de son ARNm [Welsh M.J. & Smith A.E., 1993 ; Haardt M. *et al.*, 1999]. Afin de vérifier que nos constructions n'appartiennent pas à cette catégorie de mutations, nous avons étudié leur biosynthèse par la méthode de radiomarquage au S³⁵ ou pulse-chase métabolique.

Après une période de déplétion dans un milieu sans méthionine ni cystéine, les protéines néosynthétisées étaient radiomarquées pendant 10 min dans un milieu contenant ces deux acides aminés porteurs de S³⁵. Les protéines CFTR étaient alors extraites puis immunoprécipitées avec l'anticorps monoclonal anti-HA. Après séparation des protéines sur gels SDS-PAGE à 7% d'acrylamide, les protéines étaient détectées par autoradiographie et une quantification était réalisée après analyse au Phosphorimager.

Les résultats présentés sur la **FIGURE R14 A** montrent qu'après 10 min de radiomarquage, toutes nos protéines CFTR chimériques sont détectées par autoradiographie. Ceci confirme donc que toutes ces protéines sont synthétisées, et que le processus de primo-glycosylation n'est pas affecté par les modifications apportées au gène *CFTR*. Nous pouvons

Résultats

aussi constater 10 min de radiomarquage ne sont pas suffisantes pour détecter la forme mature complex-glycosylées des protéines CFTR sauvage et $N_{1/-}$ (**FIGURE R14 A**).

D'un point de vue statistique, toutes les protéines CFTR modifiées possèdent globalement le même niveau de biosynthèse, qui représente environ 50% du niveau de synthèse de la protéine sauvage utilisée comme contrôle (**FIGURE R14 B**). Ce taux de synthèse plus faible est dû au fait que la lignée cellulaire exprimant la protéine sauvage n'est pas un mélange de clones comme nos constructions. Il s'agit d'un clone exprimant la protéine en grande quantité. D'ailleurs, lorsque nous avons réalisée cette expérience sur des cellules COS-7 exprimant de manière transitoire les protéines CFTR sauvage, $N_{2/2}$, $N_{1/-}$ et N_{-2} , le niveau de biosynthèse était très proche de celui de la protéine sauvage (**FIGURE R14 C & D**).

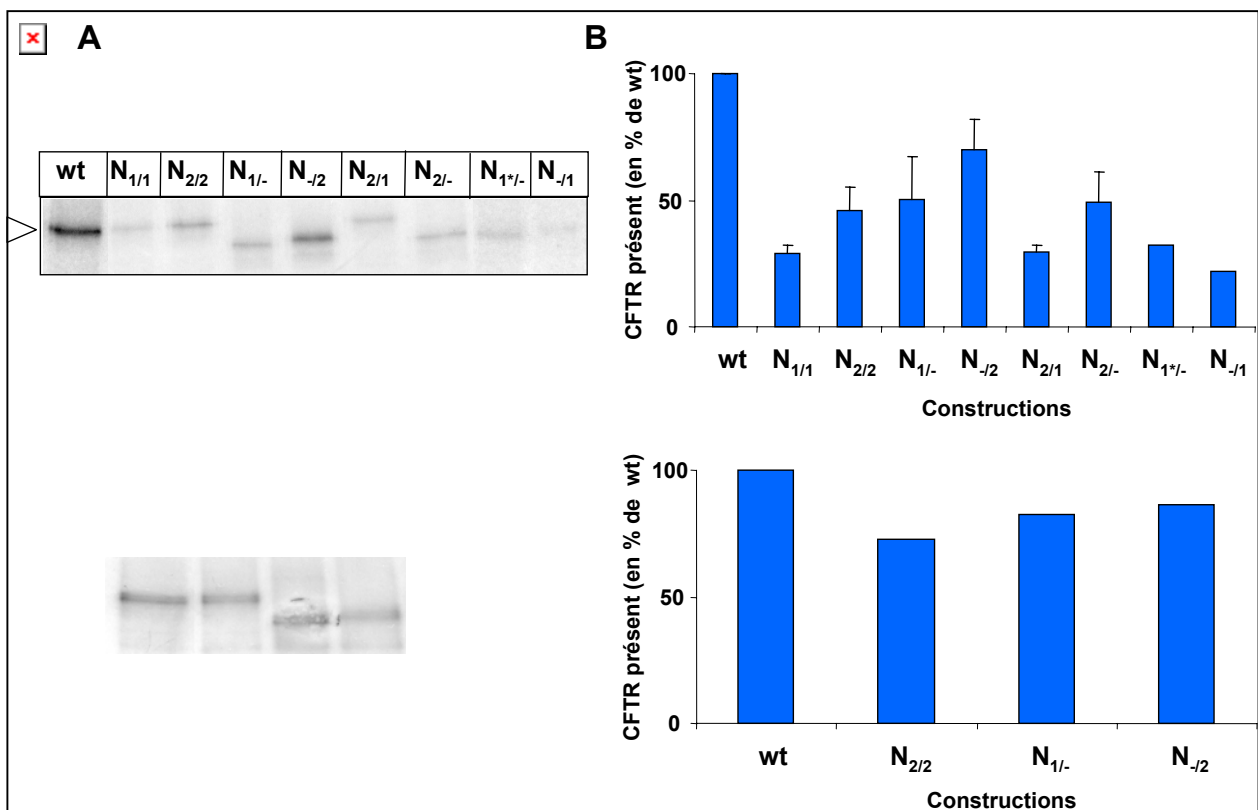


FIGURE R14 : Biosynthèse des protéines CFTR sauvage et modifiées par marquage métabolique au S^{35} . Après 10 min de marquage dans un milieu contenant de la Met et de la Cys marquées au S^{35} , les protéines exprimées stablement dans les cellules BHK-21 (A) ou transitoirement dans les cellules COS-7 (C) ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-HA. Les protéines ont ensuite été séparées sur gel SDS-PAGE à 7% d'acrylamide et révélées par autoradiographie. Les panneaux B et D représentent la quantification au Phosphorimager des différentes protéines. La quantité de protéines radiomarquées est exprimée en pourcentage par rapport à la quantité de protéine sauvage. Le panneau D est une représentation graphique la quantification de ces dernière au Phosphorimager.

D'une manière générale, la suppression, le déplacement ou la permutation des domaines NBD n'influence donc pas le processus de biosynthèse protéique.

VIII. COMPORTEMENT CELLULAIRE DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES

A. STABILITÉ DES FORMES IMMATURES

Par la technique de pulse-chase métabolique, nous avons aussi voulu déterminer la durée de vie de la forme immature de nos protéines CFTR modifiées. Pour cela, les cellules BHK-21 exprimant de manière stable ces protéines ainsi que les protéines CFTR sauvage (wt) et F508del (Δ F508), ont incorporé pendant 20 min de la cystéine et de la méthionine radioactives, puis le pool de protéines marqué a été suivi au cours du temps. Les protéines d'intérêt ont alors été immunoprécipitées, séparées sur gel d'acrylamide à 7% et révélées par autoradiographie. Les résultats obtenus confirment que la demi-vie ($T_{1/2}$) de la forme immature de CFTR sauvage (wt) est comparable à celle de CFTR-F508del (Δ F508), proche de 40 min (**FIGURE R15 & R16**). En ce qui concerne nos protéines CFTR modifiées, leur $T_{1/2}$ est similaire à celles des protéines sauvage et mutée, en moyenne d'environ 40 min (**FIGURE R15 & R16**).

Cette même expérience nous a aussi permis de confirmer nos précédentes observations en montrant que la protéine $N_{1/-}$ est capable de quitter le RE pour atteindre la forme mature complex-glycosylée (**FIGURE R15 & R16**).

Résultats

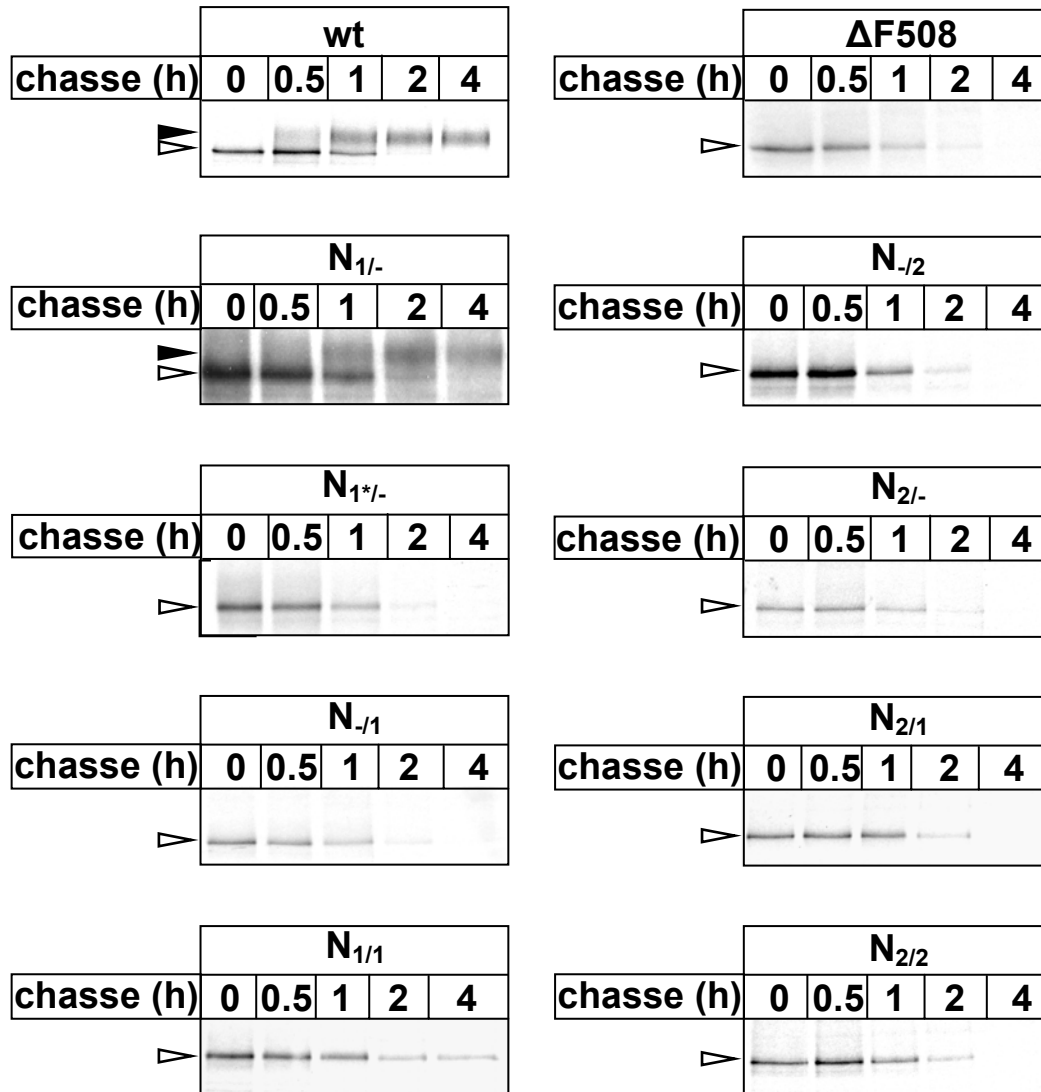


FIGURE R15 : Comportement intracellulaire des protéines CFTR sauvage (wt), F508del (Δ F508) et modifiées stablement exprimées dans les cellules BHK-21. Les cellules ont été incubées pendant 20 min dans un milieu contenant de Met et de Cys marquées au S^{35} , puis ont subi une période de chasse en étant incubées en présence de Met et de Cys froides. Par la suite les protéines radiomarquées ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-HA, séparées sur gel SDS-Page à 7% d'acrylamide et détectées par autoradiographie. La flèche vide correspond à la forme immature et la flèche pleine correspond à la forme mature.

Il existe cependant une différence entre la forme immature de N_{1/1} et celle des autres protéines, y compris celle de la protéine sauvage. En effet, celle-ci est beaucoup plus stable ($T_{1/2}$ d'environ 6 h contre environ 40 min pour les autres) (**FIGURE R17**).

Résultats

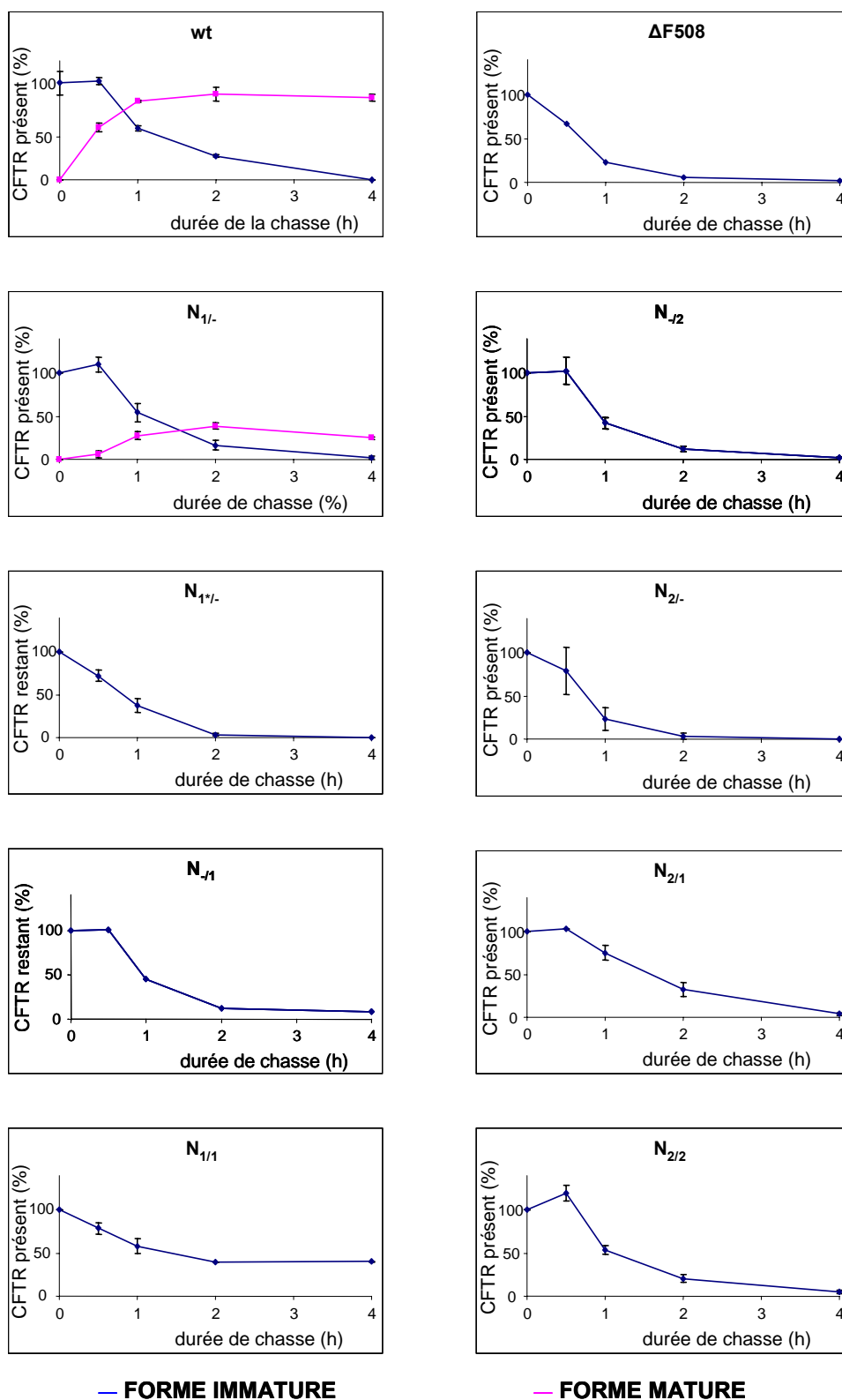


FIGURE R16 : Représentation graphique de la radioactivité associée à chacune des formes des protéines CFTR sauvage (wt), F508del ($\Delta F508$) et modifiées quantifiée au Phosphorimager. La quantité de protéines radiomarquées a été exprimée en pourcentage en fonction du temps par rapport à la quantité de la forme immature de la protéine à $t=0$. Dans chacun des cas, la courbe bleue représente la forme immature de la protéine et la courbe rose sa forme mature.

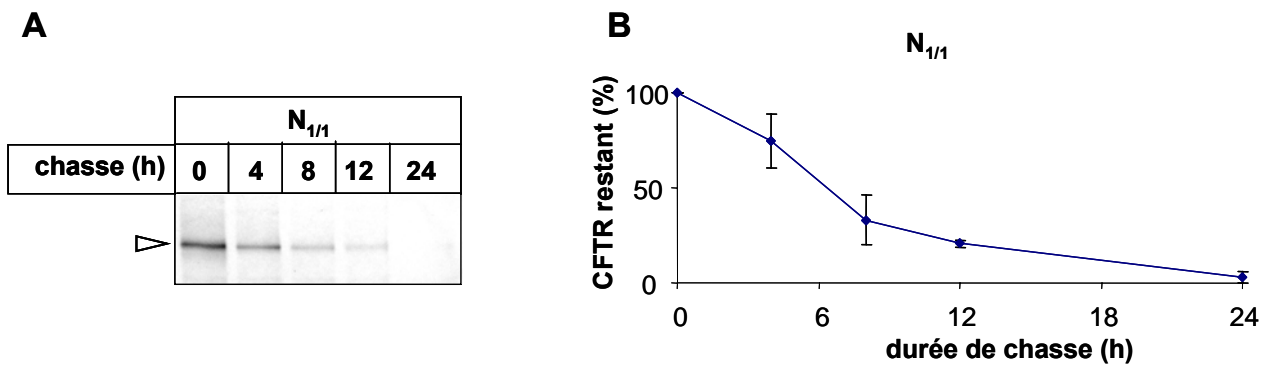


FIGURE R17 : Stabilité de la forme immature de la protéine CFTR modifiée $N_{1/1}$ en fonction du temps. La disparition de la forme immature a été suivie au cours d'une période de chasse réalisée après un marquage au S^{35} de 20 min. La protéine a ensuite été immunoprécipitée avec un anticorps anti-HA, séparée sur gel SDS-Page à 7% d'acrylamide. Le panneau A représente la détection de $N_{1/1}$ par autoradiographie (la flèche vide représente la forme immature) et le panneau B représente la quantité de protéines radiomarquées restantes en pourcentage par rapport à la quantité à $t=0$, mesurée au Phosphorimager.

B. ÉFFICACITÉ DE MATURATION DE $N_{1/-}$

D'après les résultats obtenus précédemment, seule la protéine CFTR modifiée $N_{1/-}$ est capable d'atteindre la forme mature, tout comme la protéine sauvage. Dans le but d'étudier l'efficacité de maturation de $N_{1/-}$, nous avons suivi la conversion de la forme core- en forme complex-glycosylée par pulse-chase métabolique.

La forme mature de la protéine CFTR sauvage apparaît au bout de 30 min de chasse seulement, et son niveau semble être maximum au bout de 2 h (**FIGURES R15 & R16**). Ce résultat est conforme à ce qui reporté dans la littérature [Lukacs G.L. *et al.*, 1994 ; Ward C.L. & Kopito R.R., 1994]. En ce qui concerne la protéine CFTR modifiée $N_{1/-}$, la forme mature est visible, ce qui confirme les résultats obtenus par immunodétection et par immunolocalisation (**FIGURE R15**). Quantitativement, le processus de maturation de $N_{1/-}$ est comparable à celui de la protéine sauvage (~40%). Cependant, à notre grande surprise, la vitesse de maturation de cette forme est très inférieure à celle de CFTR sauvage. En effet, celle-ci n'apparaît qu'après 1 h de chasse (**FIGURE R15 & 16**). Il existe donc un retard de maturation d'environ 30 min lorsque le domaine NBD2 est absent de la protéine CFTR.

Ces résultats montrent donc qu'en plus de son importance dans le transport des ions Cl^- à travers la membrane plasmique, NBD2 semble jouer un rôle majeur dans la rapidité du processus de maturation de la protéine CFTR.

IX. STABILITÉ DE LA PROTÉINE MODIFIÉE $N_{1/-}$

Nous venons de confirmer que parmi toutes nos constructions, seule la protéine $N_{1/-}$ était capable d'atteindre la forme mature et de s'insérer dans la membrane plasmique. A cet endroit, $N_{1/-}$ est caractérisé par sa stabilité, c'est à dire son temps de résidence.

Dans le but de déterminer ce paramètre, nous avons utilisé la technique de pulse-chase métabolique en modifiant légèrement notre protocole. En effet, pour augmenter le pool de protéines radiomarquées au S^{35} , nous avons incubé durant 2 h les cellules BHK-21 exprimant de manière stable les protéines CFTR sauvage et $N_{1/-}$ dans un milieu contenant de la méthionine et de la cystéine radioactives. Comme observé sur les **FIGURES R15** et **R16**, la forme immature de ces protéines a complètement disparu après 2 h de chasse, et la forme mature de celles-ci est présente en quantité maximale après cette période de marquage. Nous avons donc considéré le point 2 h de chasse comme le point temps, égal à 0 ($t=0$), pour lequel 100% de la forme mature de la protéine est présente.

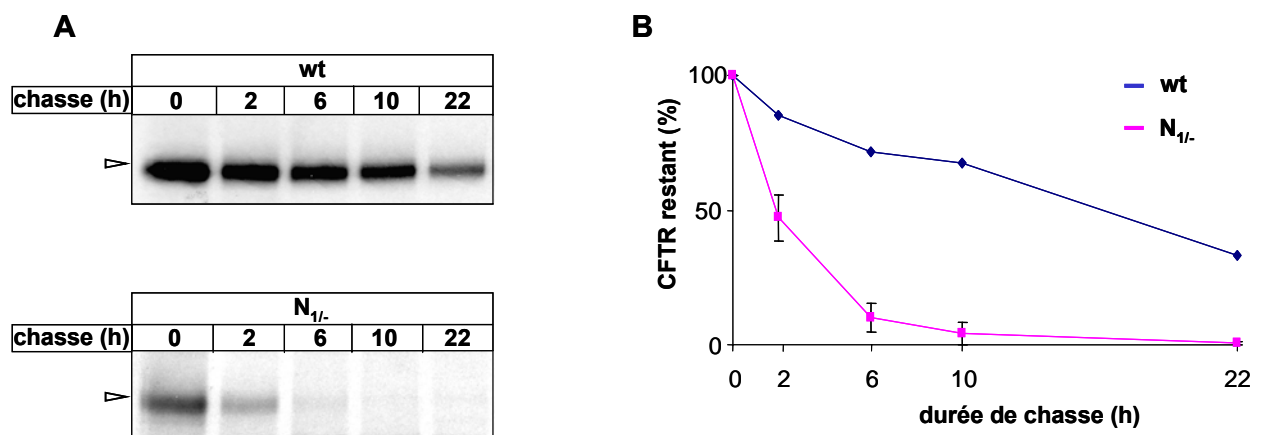


FIGURE R18 : Stabilité de la forme mature des protéines CFTR sauvage (wt) et $N_{1/-}$ évaluée en fonction du temps. La disparition de la forme mature des protéines a été suivie au cours d'une période de chasse réalisée après un marquage au S^{35} de 2h des cellules exprimant stablement nos protéines. La protéine a ensuite été immunoprécipitée avec un anticorps anti-HA, séparée des autres sur gel SDS-Page à 7% d'acrylamide. Le panneau A représente la détection de celles-ci par autoradiographie (la flèche représente la forme mature) et le panneau B représente la quantité de protéines radiomarquées restantes en pourcentage par rapport à la quantité après 2h de chasse, mesurée au Phosphorimager.

Sur le panneau A de la **FIGURE R18**, nous pouvons constater que la forme mature de la protéine sauvage est encore visible, bien que réduite, après 24 h de chasse. En intégrant les résultats obtenus lors de trois expériences indépendantes, nous avons pu déterminer une $T_{1/2}$ proche de 17 h (**FIGURE R18 B**). Pour la protéine $N_{1/-}$, la forme mature a complètement disparu après seulement 12 h de chasse (**FIGURE R18 A**), et sa $T_{1/2}$ est proche de 2 h seulement (**FIGURE R18 B**).

Ces résultats montrent que la protéine N_{1/-} est instable au niveau de la membrane plasmique. Contrairement à NBD2, le domaine NBD1 est donc nécessaire au processus de maturation de la protéine CFTR. Par contre, le domaine NBD2 est nécessaire à la fonction de transport d'ions Cl⁻ et à la stabilité de la protéine CFTR à la membrane plasmique.

X. MATURATION ARTIFICIELLE DES PROTÉINES CFTR MODIFIÉES

Par immunomarquage et marquage métabolique au S³⁵, nous avons vu que la grande majorité des protéines CFTR modifiées générées sont séquestrées au niveau du RE et sont incapables de maturer. Cependant, grâce à des moyens physiques, comme l'abaissement de la température à 26°C, ou chimiques, comme l'utilisation de glycérol dans le milieu de culture, il est possible de restaurer en partie la maturation de certaines protéines. Cette stratégie a été utilisée pour débloquer la protéine CFTR-F508del, retenue elle aussi au niveau du RE [Cheng S.H. *et al.*, 1990 ; Denning G.M. *et al.*, 1992a ; Brown C.R. *et al.*, 1996 ; Sato S. *et al.*, 1996 ; Sharma M. *et al.*, 2001].

La restauration de l'adressage des protéines par abaissement de la température ou par ajout de chaperonnes chimiques semble donc être un bon indice pour montrer que la cause du mauvais adressage est une altération du repliement de CFTR. L'utilisation de tels procédés permet aux protéines d'échapper à l'ERQC et d'atteindre la surface cellulaire où elles peuvent éventuellement être fonctionnelles.

Nous avons donc envisagé d'utiliser ces moyens afin d'évaluer le niveau de repliement de nos protéines CFTR modifiées. Pour cela, les cellules BHK-21 exprimant de manière stable les protéines CFTR sauvage (wt), F508del (ΔF) et modifiées ont été cultivées à 26°C en présence de 10% de glycérol pendant 12 h. Les protéines étaient alors extraites, séparées sur gel d'acrylamide à 7% et une immunodétection avec un anticorps anti-HA était réalisée.

Les résultats obtenus montrent qu'après traitement, la protéine CFTR-F508del est détectée à la fois sous les formes core- et complex-glycosylées (**FIGURE R19**). Ce résultat est conforme à ce qui est reporté dans la littérature [Sharma M. *et al.*, 2001]. Concernant les protéines modifiées, celles-ci semblent avoir un comportement similaire à celui de la protéine CFTR-F508del (**FIGURE R19**). Ces protéines possèdent donc un défaut de repliement. Nous avons aussi pu constater qu'après ce traitement, il y a accumulation à la fois des formes non-, core- et complexe-glycosylées des protéines CFTR sauvage et N_{1/-} (**FIGURE R19**). Il faut cependant noter que ces expériences n'ont pas été réalisées sur les protéines N_{1*/-} et N_{-/1}.

Résultats

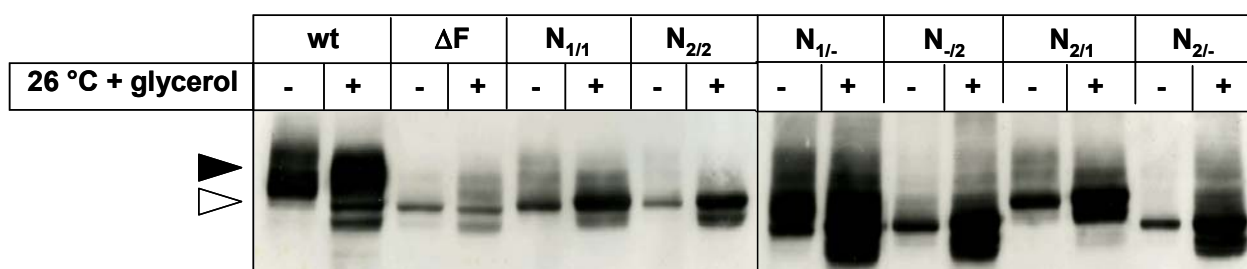


FIGURE R19 : Maturation artificielle des protéines CFTR sauvage (wt), F508del (ΔF) et modifiées. Les cellules BHK-21 exprimant de manière stable les différentes protéines ont été incubées (+) ou non (-) pendant 12h à 26°C dans un milieu contenant 10% de glycérol. Les protéines ont alors été extraites, séparées sur gel SDS-Page à 7% d'acrylamide et immunodétectées avec l'anticorps anti-HA. La flèche vide correspond à la forme immature de la protéine et la flèche pleine correspond à sa forme mature.

A ce stade, l'ensemble des résultats obtenus montre pour la première fois que le domaine NBD1 à sa position initiale dans la séquence primaire de CFTR est indispensable aux processus de repliement et de maturation (les deux semblent être fortement liés). Le domaine NBD2, quant à lui, n'est pas indispensable à ces deux processus, mais semble jouer un rôle déterminant dans la stabilité membranaire et dans la fonction canal Cl^- de CFTR.

XI. ÉTUDE DU REPLIEMENT DES PROTÉINES MODIFIÉES

La majorité des protéines CFTR modifiées que nous avons créées est séquestrée au niveau du RE et rapidement dégradée. Or la plupart des études réalisées jusqu'alors montre que les protéines CFTR séquestrées et rapidement dégradées au niveau du RE présentent un défaut de repliement [Denning G.M. *et al.*, 1992a ; Thomas P.J. *et al.*, 1992b ; Thomas P.J. & Pedersen P.L., 1993].

De plus, les résultats obtenus après maturation artificielle de nos constructions à 26°C en présence de glycérol montrent que les comportements observés sont sans doute dus à des problèmes de repliement. En outre, le même constat pouvait être fait pour la protéine $N_{1/-}$ quant à son instabilité à la membrane plasmique. En effet, ce cas de figure a déjà été démontré pour la protéine CFTR- $\Delta T70$ [Benharouga M. *et al.*, 2001].

Pour apporter la confirmation expérimentale de la présence ou non d'un défaut de repliement global dans nos constructions, trois différents protocoles ont été utilisés : la thermoaggrégation, la thermostabilité et la protéolyse ménagée.

A. PAR THERMOAGRÉGATION

La méthode de thermoaggrégation a été utilisée pour la première fois par Sharma et collaborateurs pour étudier le repliement de la protéine CFTR-F508del [Sharma M. *et al.*,

2001]. Cette méthode est basée sur le fait qu'une protéine correctement repliée aura moins tendance à s'agréger. Si, par rapport à la protéine sauvage, nos protéines CFTR modifiées possèdent une altération du processus de repliement, elles devraient donc avoir tendance à s'agréger beaucoup plus facilement lorsque la température d'incubation augmente. Si ce processus n'est pas touché, alors la température moyenne d'agrégation de ces protéines devrait être comparable à celle de la protéine sauvage.

Pour étudier cette agrégation, les protéines CFTR sauvage, F508del et modifiées exprimées stablement dans les cellules BHK-21, ont été extraites après solubilisation au SDS, puis incubées 5 min à différentes températures: 37, 60, 80 ou 100°C. Les agrégats insolubles étaient ensuite sédimentés par centrifugation et les protéines CFTR monomériques restant dans le surnageant étaient alors observées et quantifiées par immunodétection en utilisant l'anticorps monoclonal anti-HA. La thermoagrégation des différentes protéines CFTR solubilisées était alors caractérisée en mesurant la température d'agrégation (T_a), à laquelle 50% de la protéine monomérique sont convertis en agrégats SDS-résistants. Dans le cas des protéines capables de maturer, c'est la forme mature qui a été suivie, comparée à celle de CFTR sauvage. Dans le cas contraire, c'est la forme immature qui a été comparée à celle de CFTR-F508del.

Pour confirmer que l'agrégation observée est uniquement due à l'augmentation de la température, les mêmes expériences ont été réalisées en présence de 8 M d'urée, qui par son action dénaturante va empêcher l'agrégation des protéines engendrée par la température [Sharma M. *et al.*, 2001].

Les résultats obtenus montrent qu'avec l'augmentation de la température, la protéine CFTR-F508del ($\Delta F508$) a tendance à s'agréger beaucoup plus vite que la protéine sauvage (wt) (**FIGURE R20**). La T_a de la protéine mutée a en effet été mesurée à environ 70°C alors que celle de la protéine sauvage a été mesurée à environ 86°C (**FIGURE R21 & TABLEAU R1**). Ces résultats sont conformes à ceux de la littérature [Sharma M. *et al.*, 2001], et confirment qu'il existe une différence structurale entre CFTR sauvage et F508del.

Comme attendu, les résultats obtenus pour les protéines CFTR modifiées possédant des NBDs inversés, déplacés ou supprimés sont très hétéroclites. Tout d'abord, à notre grande surprise, la protéine $N_{1/-}$, possédant une forme mature mais très instable par rapport à celle de la protéine sauvage, semble résister à l'agrégation avec une T_a d'environ 80°C (**FIGURE R20 & R21, TABLEAU R1**). La même observation a été réalisée pour la protéine $N_{1/1}$, incapable de maturer mais possédant une forme immature beaucoup plus stable que celle des autres protéines, avec une T_a d'environ 75°C, cependant un peu plus faible que celles des

Résultats

protéines sauvage et $N_{1/-}$ (**FIGURE R20 & R21, TABLEAU R1**). Contrairement à ces deux premières protéines modifiées, le reste des protéines CFTR, $N_{2/2}$, $N_{-/2}$, $N_{2/1}$, $N_{2/-}$, $N_{-/1}$ et $N_{1*-/}$, se comportent comme la protéine CFTR-F508del. Elles ont en effet tendance à s'agréger beaucoup plus facilement et possèdent une T_a proche de 70°C (**FIGURE R20 & R21, TABLEAU R1**).

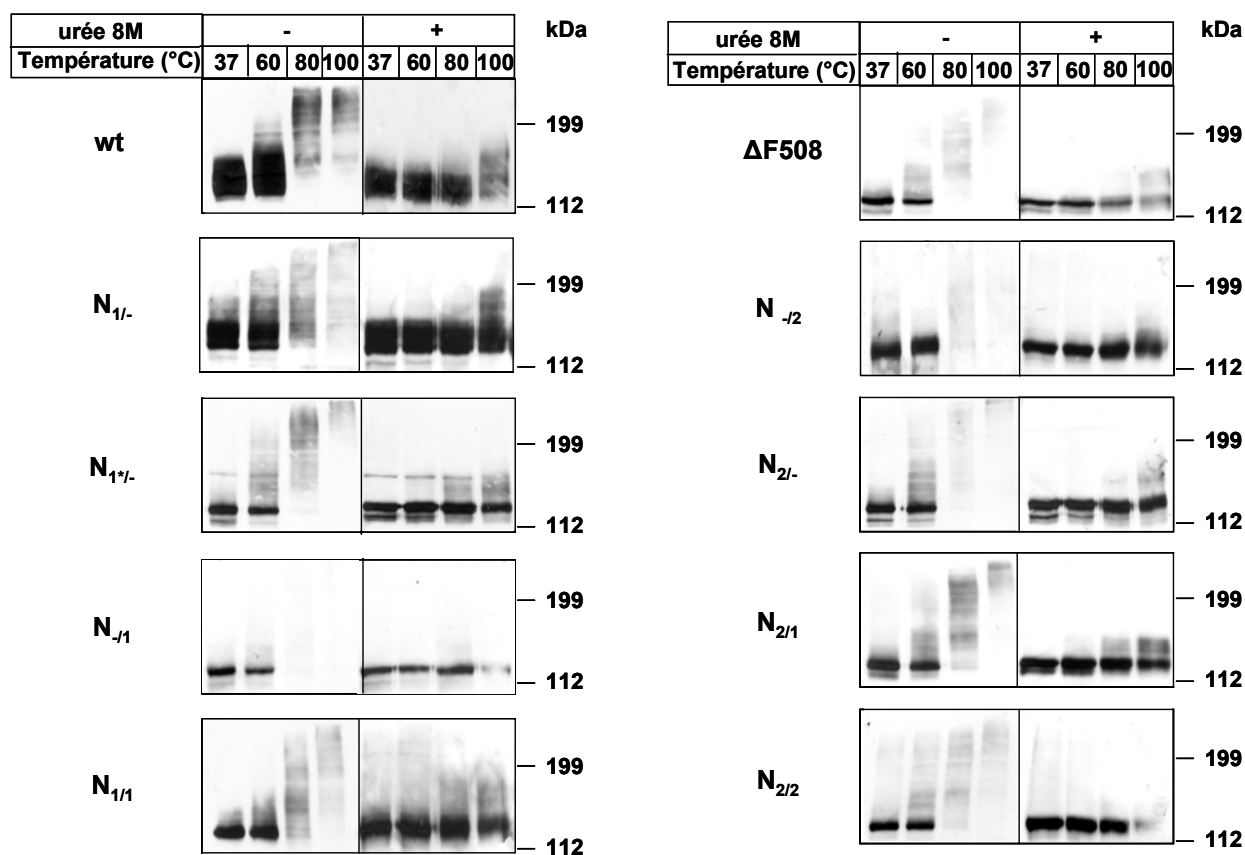


FIGURE R20 : Thermoaggrégation des protéines CFTR sauvage, mutée F508del et modifiées stablement exprimées dans les cellules BHK-21. Les protéines ont été solubilisées dans du LSB 2x et incubées à la température indiquée en présence ou non d'urée 8M. Celles-ci ont par la suite été séparées sur gel SDS-Page à 7%, électrotransférées et révélées par immunodétection avec l'anticorps anti-HA.

Résultats

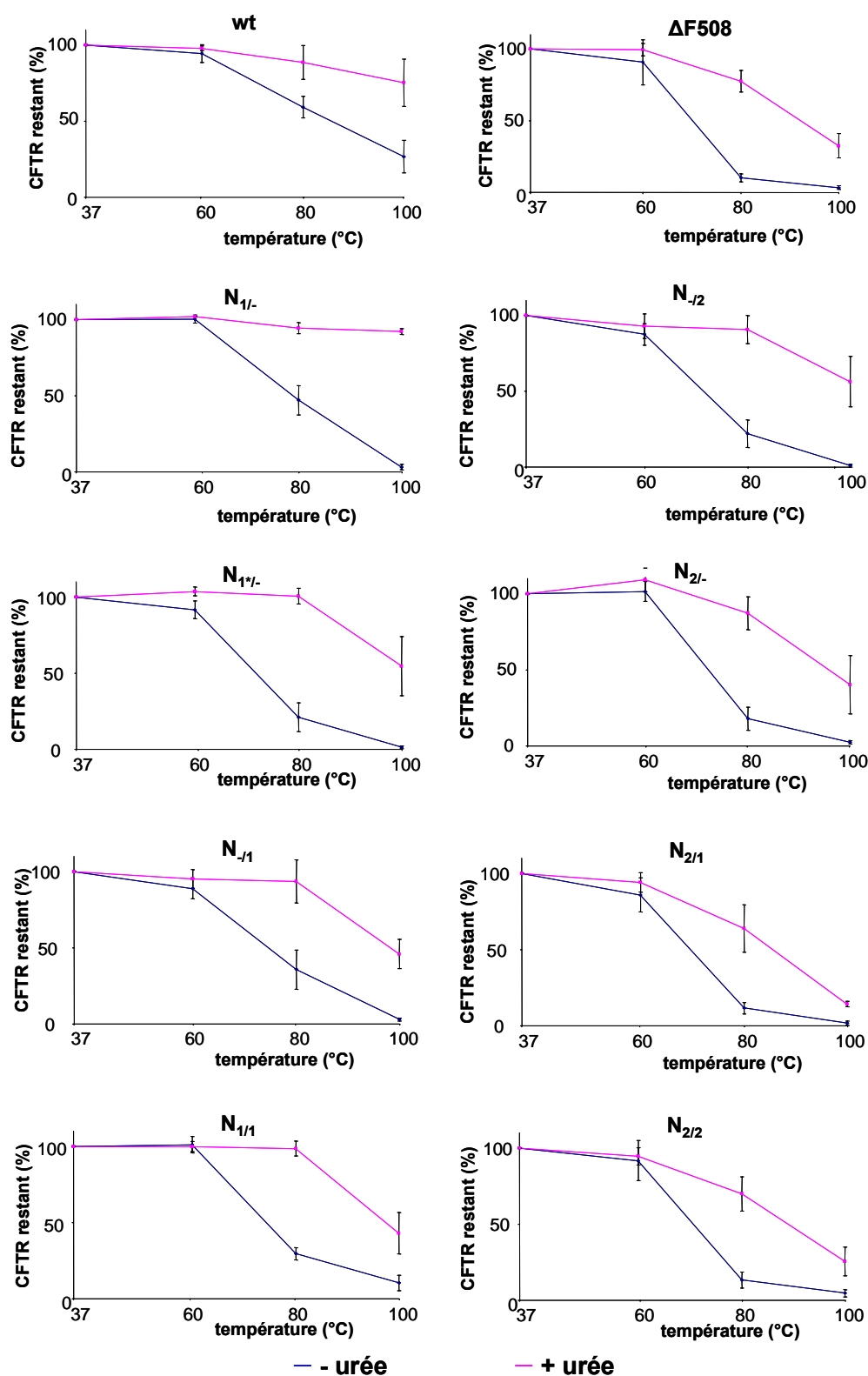


FIGURE R21 : Représentation graphique de la tendance à la thermoaggrégation des protéines CFTR sauvage, F508del et modifiées. Les protéines CFTR exprimées stablement dans les cellules BHK-21 ont été extraites, dénaturées dans du LSB 2X et incubées à la température indiquée en présence ou non d'urée 8M. Celles-ci ont par la suite été séparées sur gel SDS-Page à 7%, électrotransférées et révélées par immunodétection avec l'anticorps anti-HA. La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Scion Image (*Scion Corp., USA*).

Résultats

Lorsque les dénaturations thermiques sont réalisées en présence de LSB supplémenté par 8 M d'urée, seules des différences très faibles dans la tendance à la thermoaggrégation sont observées entre les différentes protéines CFTR modifiées (**FIGURES R20 & R21, TABLEAU R1**). Ces résultats confirment que les différents comportements observés pour nos protéines modifiées sont dûs à des différences structurales.

construction	CFTR									
	Wt	ΔF	N _{1/1}	N _{2/2}	N _{1/-}	N _{-/2}	N _{2/1}	N _{2/-}	N _{1*/-}	N _{-/1}
T _a (°C)	86	70	75	71	80	70	70	72	72	74

TABLEAU R1 : Tableau reportant les températures moyennes d'agrégation de chacune des constructions en °C.

Par cette première technique, nous avons vu que la majorité des protéines CFTR modifiées était globalement mal repliée. Nous nous sommes donc focalisés sur les deux protéines qui possèdent un niveau correct de repliement, N_{1/-} et N_{1/1}.

B. PAR THERMOSTABILITÉ

Dans le but de confirmer que les protéines CFTR modifiées N_{1/-} et N_{1/1} sont correctement repliées, nous avons utilisé une autre technique permettant d'apprécier le degré de repliement des protéines de manière indirecte : la méthode de thermostabilité.

La thermostabilité, basée sur la technique de pulse-chase métabolique, a déjà été utilisée pour montrer que la mutation F508del entraînait une altération du repliement de la protéine CFTR [Sharma M. *et al.*, 2001]. Pour cela, les cellules exprimant de manière stable les protéines CFTR sauvage, N_{1/-} et N_{1/1} ont été incubées pendant 2 h dans un milieu contenant de la méthionine et de la cystéine marquées au S³⁵, puis une période de chasse a été réalisée dans un milieu de culture classique pendant 2, 4, 8, 12 et 24 h à différentes températures : 26, 37 ou 40°C. Les protéines étudiées ont alors été immunoprécipitées, séparées sur gel d'acrylamide à 7% et suivies par autoradiographie. Une quantification a ensuite été réalisée à l'aide d'un Phosphorimager (2 h de chasse étant considéré comme le point t=0).

A 37°C, température physiologique, la forme mature de la protéine CFTR sauvage est encore présente après 24 h de chasse, et sa T_{1/2} est d'environ 17 h. Celle de N_{1/-} a complètement disparue après 10 h, et sa T_{1/2} est d'environ 2 h seulement, (**FIGURES R22 & R23**). De même, à 37°C, la forme immature de N_{1/1} est toujours présente après 12h de chasse et sa T_{1/2} est d'environ 6 h (**FIGURES R22 & R23**).

Résultats

Lorsque la température de chasse est abaissée à 26°C, la forme mature de la protéine sauvage est fortement stabilisée. La $T_{1/2}$ de $N_{1/-}$ dans ces conditions est proche de 9 h (FIGURES R22 & R23). De manière similaire, la forme immature de $N_{1/1}$ est encore détectable après 24 h à 26°C et sa $T_{1/2}$ est proche de 10 h (FIGURES R22 & R23).

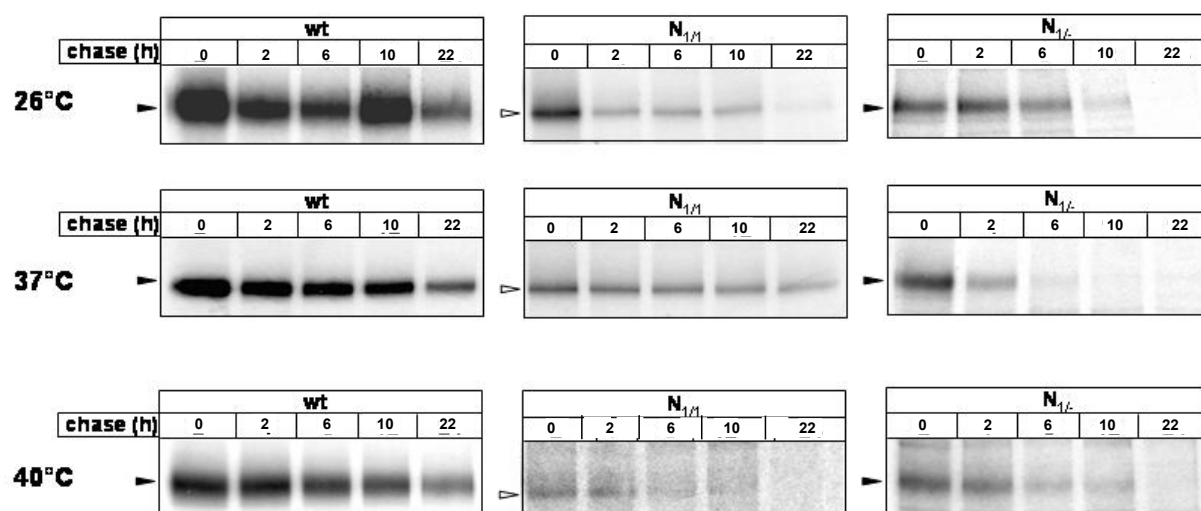


FIGURE R22 : Thermostabilité des protéines CFTR sauvage, $N_{1/1}$ et $N_{1/-}$ évaluée par marquage métabolique au S^{35} . La disparition des protéines a été suivie au cours d'une période de chasse réalisée à température variable après un marquage au S^{35} de 2 h et d'une chasse initiale de 2 h. Les protéines ont ensuite été immunoprécipitées avec un anticorps anti-HA, séparées sur gel SDS-Page à 7%. Celles-ci ont ensuite été détectées par autoradiographie. La flèche pleine représente la forme mature et la flèche vide la forme immature de CFTR.

A l'opposé, lorsque la période de chasse est réalisée à 40°C, les formes matures des protéines CFTR sauvage et $N_{1/-}$ présentent une stabilité presque similaire à celle observée à 37°C avec des $T_{1/2}$ d'environ 17 h pour CFTR sauvage et d'environ 2 h pour $N_{1/-}$ (FIGURE R22 & R23). A cette température, nous avons cependant remarqué une déstabilisation un peu plus prononcée de la forme immature de $N_{1/1}$, qui présente une $T_{1/2}$ d'environ 2 h (FIGURE R22 & R23).

Résultats

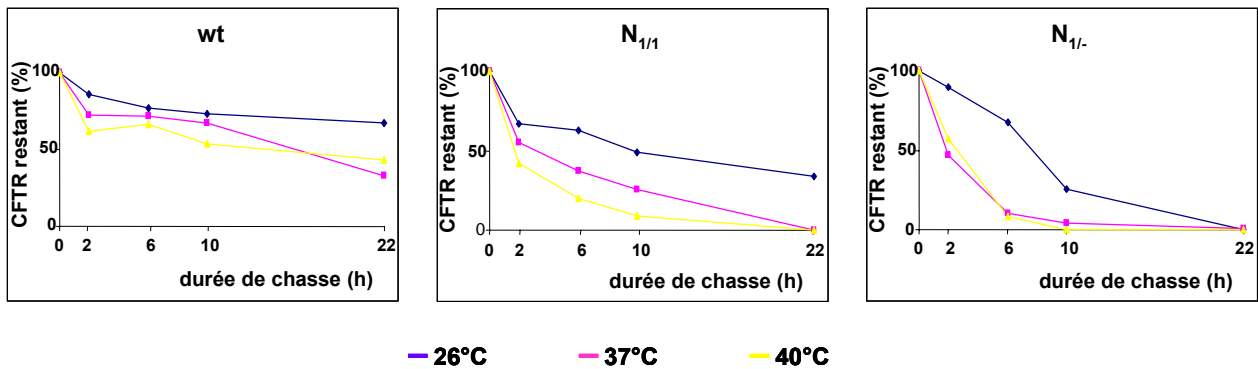


FIGURE 23 : Représentation graphique de la thermostabilité de chacune des formes des protéines CFTR sauvage (wt), N_{1/1} et N_{1/-} en fonction du temps mesurée au Phosphorimager. La quantité de protéine radiomarquée restante a été exprimée en pourcentage par rapport à la quantité de protéine radiomarquée à t=0.

Ainsi, les résultats de ces expériences de thermostabilité confirment ceux de la thermoaggrégation et montrent que la protéine N_{1/-} est une protéine qui possède un degré de repliement comparable à celui de la protéine CFTR sauvage. Nous avons aussi obtenu la confirmation que la protéine N_{1/1}, retenue dans le RE, est une protéine globalement bien repliée avec probablement quelques défauts locaux de structure qui causent sa reconnaissance par le système ERQC.

C. PAR PROTÉOLYSE MÉNAGÉE

Dans le but de confirmer l'absence de défauts globaux de repliement des protéines N_{1/-} et N_{1/1} par rapport à la protéine CFTR sauvage et mutée F508del, nous avons utilisé une troisième méthode, la protéolyse ménagée à la trypsine.

Cette méthode est basée sur le fait que des différences observées dans la susceptibilité des protéines à des concentrations croissantes de trypsine sont forcément dues à une modification de leur conformation. La protéolyse ménagée avait déjà été utilisée par l'équipe de Lukacs pour montrer que la protéine CFTR mutée F508del était globalement mal repliée [Zhang F. *et al.*, 1998 ; Sharma M. *et al.*, 2001].

Les expériences de protéolyse ménagée ont été réalisées sur des microsomes isolés par des centrifugations différentielles à partir des cellules BHK-21 exprimant stablement les protéines CFTR sauvage, F508del, N_{1/-} ou N_{1/1}. L'utilisation d'une bombe à cavitation d'azote nous a permis, dans le cas des protéines CFTR sauvage et N_{1/-}, d'avoir des microsomes orientés dans le bon sens, à savoir le côté cytoplasmique de la protéine vers l'extérieur et son côté extracellulaire vers l'intérieur. Ainsi, nous avons pu étudier la conformation de ces protéines dans leur environnement lipidique natif.

Résultats

Pour réaliser nos protéolyses ménagées, nous avons tout d'abord digéré les protéines contenues dans les microsomes par des concentrations croissantes de trypsine (0, 10, 50, 100, 500 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$) pendant 15 min à 4°C. Puis les peptides ont été séparés sur gel SDS-PAGE à 11% d'acrylamide, et les protéines ont été suivies par immunodétection avec l'anticorps monoclonal anti-CFTR L12B4. Afin de pouvoir comparer les profils de digestion ainsi obtenus, la même quantité de protéines était déposée dans les puits du gel d'acrylamide, 50 μg et les films étaient exposés pendant la même durée.

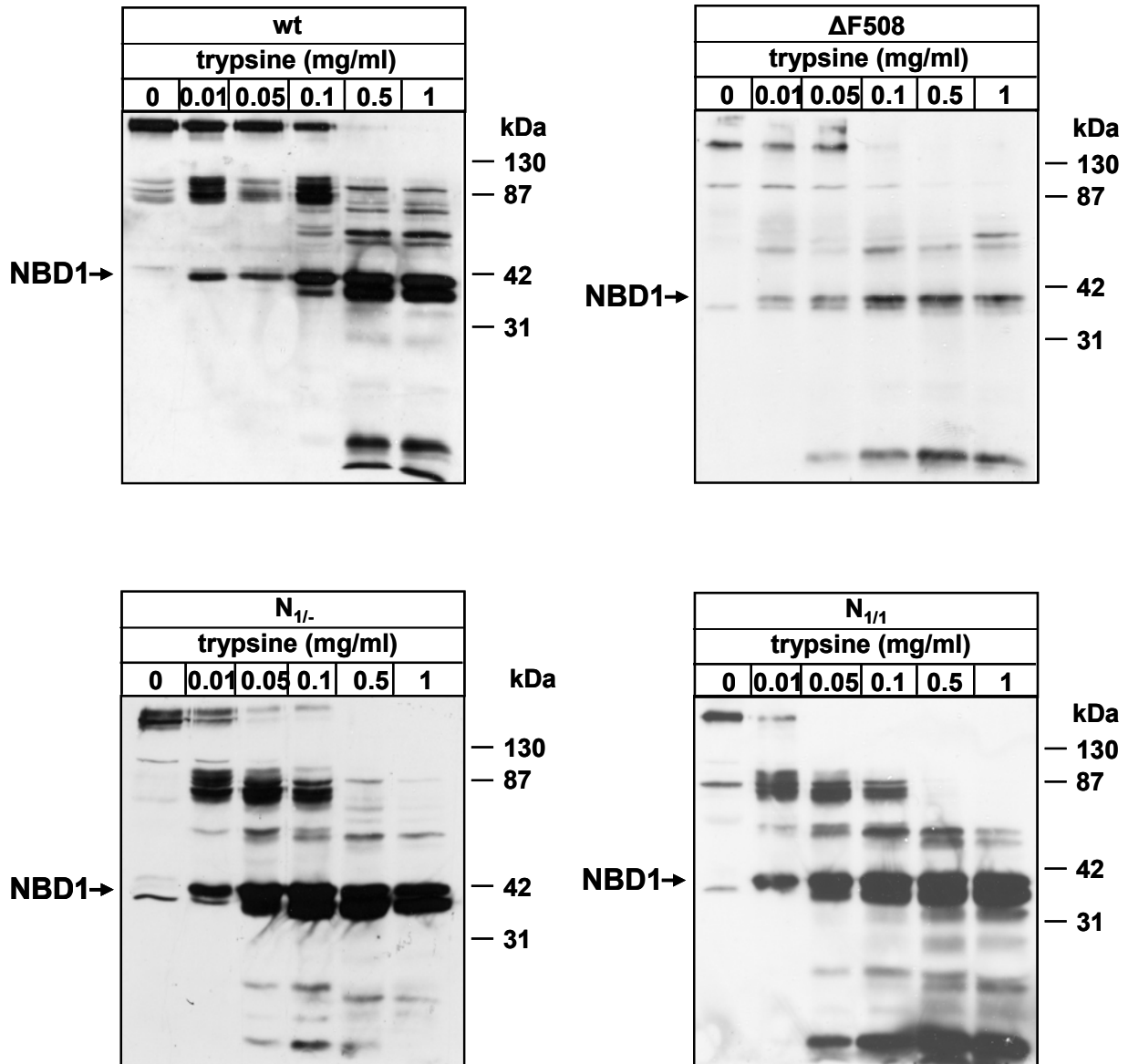


FIGURE R24 : Profil de digestion à la trypsine des protéines CFTR sauvage (wt), F508del (ΔF508), $\text{N}_{1/1}$ et $\text{N}_{1/-}$ exprimées stablement dans les cellules BHK-21. Les protéines ont été digérées par des concentrations croissantes de trypsine. Le profil électrophorétique des peptides a été déterminé par immunodétection en utilisant l'anticorps anti-CFTR L12B4 après migration sur gel SDS-PAGE à 11% d'acrylamide et électrotransfert.

Résultats

Les résultats ainsi obtenus montrent que le profil de la protéine CFTR sauvage évolue en fonction de la concentration croissante de trypsine. Dans les mêmes conditions de durée et de température, plus la concentration en trypsine est grande et plus la protéine est dégradée. Cependant, CFTR est assez stable pour que des peptides soient encore visibles malgré un traitement à la trypsine à une concentration de 1000 µg/mL (**FIGURE R24**). Il est aussi remarquable de noter qu'avec l'augmentation de la concentration en enzyme, il apparaît un peptide d'environ 39 kDa détectable avec l'anticorps anti-CFTR L12B4 et qui, d'après la littérature, pourrait correspondre au domaine NBD1 [Du K. *et al.*, 2005]. Ce peptide est encore présent lorsque la protéine est traitée à une concentration de 1000 µg/mL de trypsine, confirmant ainsi les études précédentes montrant que le domaine NBD1 est bien structuré et est plutôt compact [Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005 ; Du K. *et al.*, 2005]. Le profil de digestion de CFTR-F508del montre que la protéine est plus sensible à la trypsine (**FIGURE R24**). Le fragment correspondant à NBD1 est encore présent après digestion à une concentration de 1000 µg/mL de trypsine, mais en quantité beaucoup plus faible.

Comme nous l'attendions et au vu des résultats obtenus par les techniques de thermoaggrégation et de thermostabilité, le profil de digestion à la trypsine de la protéine N_{1/-} est très proche de celui obtenu pour la protéine sauvage (**FIGURE R24**). Malgré la suppression du domaine NBD2, des peptides correspondant à la protéine sont encore détectables après traitement par 1000 µg/mL de trypsine, démontrant ainsi une stabilité semblable à celle de la protéine sauvage. Le peptide d'environ 39 kDa correspondant au NBD1 est lui aussi détectable à une intensité très proche de celle avec laquelle on le détecte dans la protéine sauvage. Ceci implique que la suppression de NBD2 n'influence pas la conformation du domaine NBD1 et probablement pas celle de la protéine entière non plus.

Le niveau de repliement de la protéine CFTR chimérique N_{1/1} a lui aussi été étudié par protéolyse ménagée à partir de microsomes, et les résultats obtenus sont présentés sur la **FIGURE R24**. Comme pour la protéine modifiée N_{1/-}, le profil de digestion à la trypsine de N_{1/1} était très proche de celui de la protéine sauvage. Ce résultat confirme que le domaine NBD2 n'est pas nécessaire pour que CFTR atteigne sa conformation finale, mais aussi que l'ajout d'un deuxième NBD1 ne déstabilise pas cette conformation. Comme pour N_{1/-}, les peptides de plus de 40 kDa issus de la digestion de N_{1/1} semblent cependant être beaucoup plus sensibles à la trypsine que ceux issus de la digestion de la protéine sauvage.

Ainsi, par 3 techniques différentes, nous avons montré *in vivo* que le retard de maturation et le défaut de stabilité de la forme mature de la protéine N_{1/-} n'étaient pas dus à un défaut de repliement de celle-ci. Ce défaut peut être dû au fait qu'une interaction entre NBD1 et

d'autres domaines, dont NBD2, est nécessaire pour la stabilité mais d'intérêt mineur pour le repliement. De même, nous avons montré, par ces 3 techniques, que la séquestration de N_{1/1} dans le RE n'est pas non plus due à un défaut de repliement.

XII. CONCLUSION

Dans cette partie de mon travail, nous avons essayé de préciser les rôles des NBDs dans le repliement et le comportement cellulaire de CFTR.

Nous avons ainsi montré que :

- le déplacement, l'inversion ou la suppression des NBDs n'altère pas la biosynthèse et la glycosylation de CFTR.
- le domaine NBD1 est nécessaire aux processus de repliement, de maturation et de trafic intracellulaire de CFTR.
- la position du NBD1 dans la séquence primaire de la protéine ainsi que la présence de la F508 sont déterminantes pour son action.
- NBD2 est nécessaire à la vitesse de maturation, à la fonction et surtout à la stabilité membranaire de CFTR.

Résultats

Partie II

Dans la première partie de mon travail, nous avons suggéré que les interactions interdomaines, en particulier NBD1/TMD1, étaient très importantes pour le repliement et la maturation de CFTR. Dans le but d'apprécier l'importance des TMDs dans ces phénomènes, nous nous sommes intéressés aux rôles des segments 6 (S6) et 12 (S12).

I. OBTENTION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES

Il est à ce jour bien établi que le segment transmembranaire 6 joue un rôle très important dans la protéine CFTR, que ce soit dans le transport des ions chlorure en formant le pore, ou dans le repliement et la maturation efficace de la protéine [Riordan J.R., 2005]. L'interaction entre S6 et S12 a elle aussi déjà été démontrée par pontage chimique [Chen E.Y. *et al.*, 2004]. Celle-ci semble être importante pour le repliement post-traductionnel et pour la formation du pore de CFTR. Cependant, en l'absence de structure à haute résolution de CFTR, il est impossible de définir précisément ces rôles.

Afin d'étudier le ou les rôle(s) du S6 et du S12, nous avons choisi de les supprimer en présence ou en l'absence de la F508. Ainsi, 6 nouvelles protéines CFTR modifiées ont été créées par la méthode SOE (**FIGURE R25**).

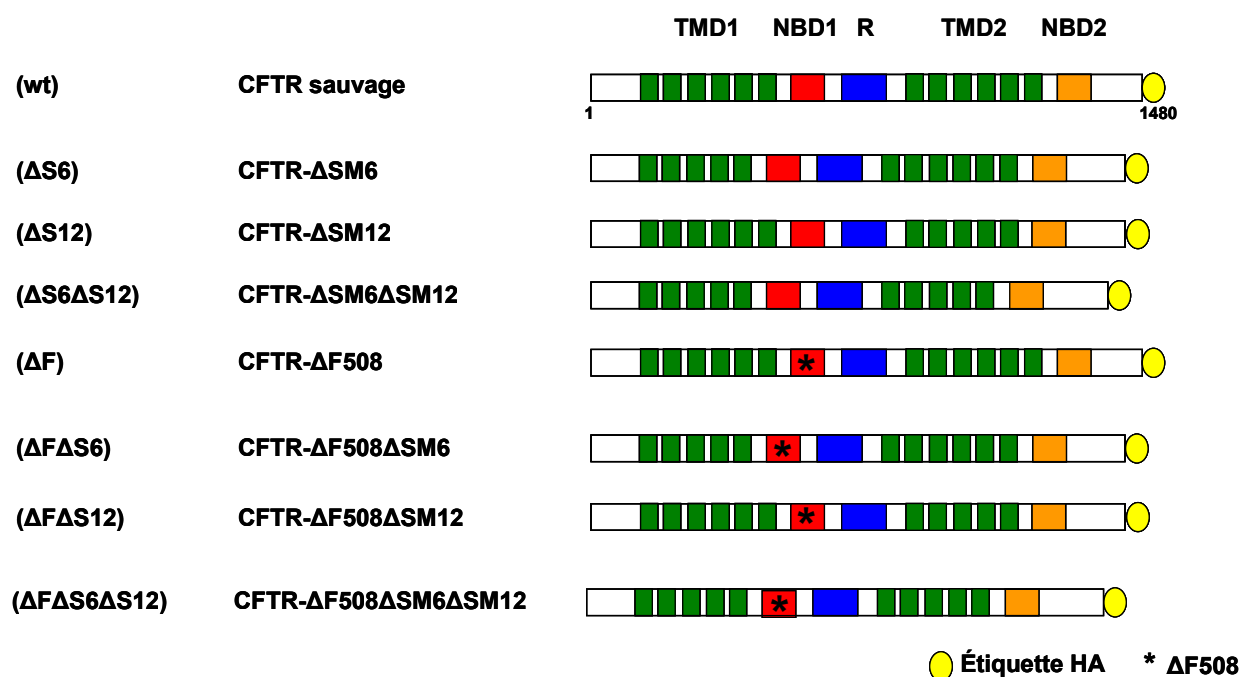


FIGURE R25: Représentation schématique des protéines CFTR mutées possédant des segments transmembranaires supprimés. Les segments transmembranaires sont colorés en vert, le domaine R en bleu, NBD1 en rouge, NBD2 en orange et l'étiquette hémagglutinine en C-terminale en jaune. Lorsque la F508 est supprimée, NBD1 est marqué par une étoile.

Résultats

La matrice de départ utilisée pour réaliser ces constructions par la méthode SOE (**Matériels et Méthodes**) était le plasmide pcDNA3.1 codant pour la protéine CFTR flanquée en sa partie C-terminale d'une étiquette HA. Grâce à ses deux tours de PCR, cette méthode nous a permis de créer 2 gènes codant pour 2 protéines CFTR mutées : CFTR- $\Delta 6$ ($\Delta 6$) et CFTR- $\Delta 12$ ($\Delta 12$) (**FIGURE R26**). Tous les autres gènes modifiés ont par la suite été générés par digestion/ligation des deux premières séquences. L'ensemble des constructions ont été vérifiées par digestion enzymatique et par séquençage.

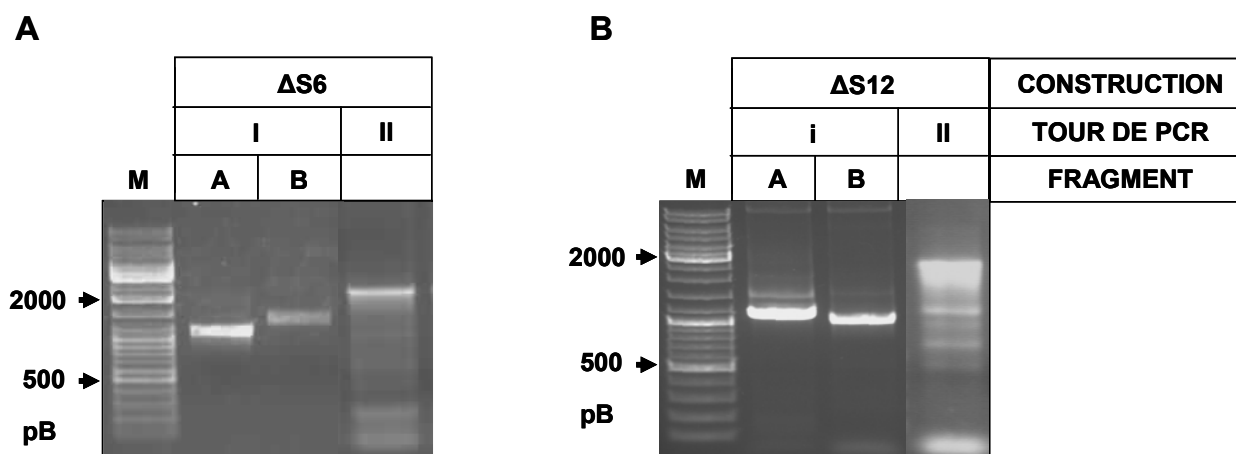


FIGURE R26 : Résultats des différents tours de PCR (1 & 2) de la méthode de SOE obtenus pour construire les gènes codant pour les protéines CFTR- $\Delta 6$ ($\Delta 6$) et CFTR- $\Delta 12$ ($\Delta 12$). Les fragments ont été séparés sur un gel d'agarose à 0,8%. M représente le marqueur de taille.

A partir de la topologie prédite de CFTR, les segments S6 et S12 sont respectivement suivis par les domaines cytoplasmiques NBD1 et NBD2. Ceci implique que leur suppression pose un important problème d'orientation de la protéine CFTR.

Cependant, S6 est un segment qui possède 3 charges qui peuvent potentiellement le déstabiliser et par conséquent empêcher son insertion dans la membrane du RE [Tector M. & Hartl F.U., 1999]. Quant au segment S12, il a été choisi parce qu'il ne contient pas de charges, qu'il est l'équivalent du S6 dans le TMD2 (il peut donc être utilisé comme contrôle interne) et parce qu'il interagit avec S6 [Chen E.Y. *et al.*, 2004].

II. PROFIL D'EXPRESSION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES

Pour vérifier que la suppression de S6 et S12 n'altère pas la biosynthèse de CFTR, nous avons déterminé le profil d'expression de nos différentes constructions par immunodétection en utilisant trois anticorps monoclonaux: un anti-HA et deux anti-CFTR, L12B4 et M3A7

[Kartner N. *et al.*, 1992]. Pour cela, ces protéines mutées ont été exprimées transitoirement et stablement respectivement dans les cellules COS-7 et BHK-21.

A. TRANSFECTIONS TRANSITOIRES

Dans un premier temps, les différentes constructions ainsi que les gènes codant pour CFTR sauvage (wt) et muté F508del (Δ F508) insérés dans le plasmide pcDNA3.1 ont été introduits de manière transitoire dans des cellules COS-7. 48 h après la transfection, les protéines étaient extraites, séparées sur gel SDS-PAGE à 7% d'acrylamide, électrotransférées sur membrane de nitrocellulose et les protéines d'intérêt étaient révélées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-HA (**FIGURE R27**).

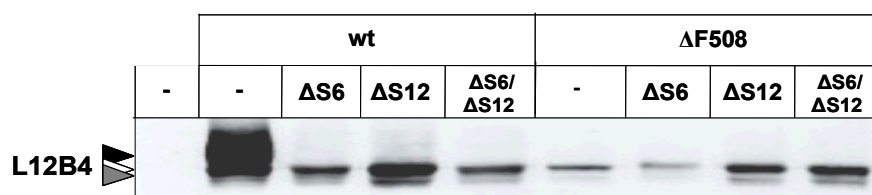


FIGURE R27 : Expression basale des protéines CFTR sauvage (wt), mutée F508del (Δ F) et modifiées exprimées transitoirement dans les cellules COS-7. La flèche grise représente la forme non-glycosylée, la flèche blanche représente la forme immature core-glycosylée et la flèche noire la forme mature complex-glycosylée.

Les résultats montrent tout d'abord que la délétion des segments transmembranaires S6 et/ou S12 n'altère pas la synthèse de la protéine CFTR. L'analyse du profil d'expression de ces protéines montre que contrairement à la protéine sauvage capable d'atteindre la forme mature, la délétion des S6, S12 ou des deux simultanément bloque la maturation de la protéine CFTR (**FIGURE R27**). La présence ou l'absence de la F508, probablement très importante pour les interactions entre NBD1 et TMD1, ne modifie pas les profils d'expression observés pour nos différentes constructions (**FIGURE R27**).

Ainsi, l'altération des domaines transmembranaires, par la délétion de S6 et/ou S12 n'empêche pas la biosynthèse de la protéine CFTR mais empêche sa maturation. Il n'y a pas d'effets cumulatifs ou de restauration de la maturation lorsque ces segments sont délétés dans une même protéine, en présence ou en l'absence de la F508.

B. TRANSFECTIONS STABLES

Dans le but de faciliter notre étude sur les segments transmembranaires 6 et 12, nous avons choisi de générer des lignées cellulaires BHK-21 qui expriment de manière stable nos différentes constructions. Après sélection par le méthotrexate (voir **Matériels & Méthodes**)

Résultats

et obtention d'un mélange de cellules BHK-21 résistantes, nous avons cherché à vérifier la synthèse de nos différentes constructions et à comparer leur profil d'expression à celui obtenu dans les cellules COS-7.

Pour cela, les protéines extraites de ces lignées cellulaires ont été séparées sur gel SDS-PAGE à 7% d'acrylamide, électrotransférées sur membrane de nitrocellulose et les protéines d'intérêt ont été révélées par immunodétection. L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-HA confirme les résultats obtenus pour les protéines CFTR mutées exprimées transitoirement dans les cellules COS-7 (**FIGURE R28**).

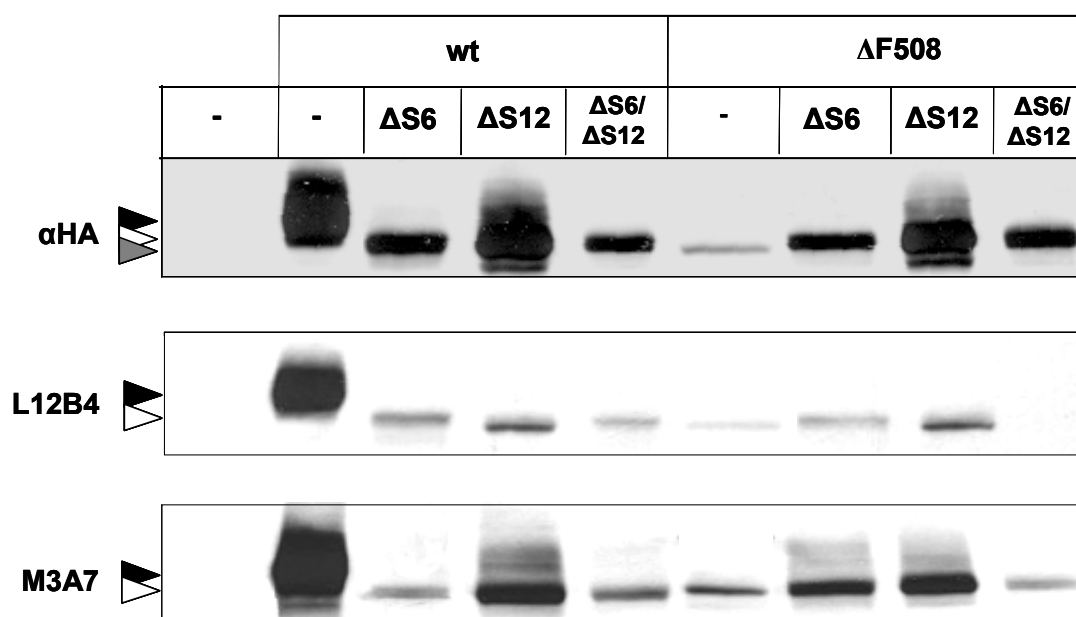


FIGURE R28: Expression basale des protéines CFTR sauvage (wt), F508del (ΔF508) ou modifiées exprimées stablement dans les cellules BHK-21. Les résultats ont été obtenus à l'aide de 3 anticorps différents: un anti-HA et deux spécifiques de CFTR, le L12B4 et le M3A7. La flèche grise représente la forme non-glycosylée, la flèche blanche représente la forme immature core-glycosylée et la flèche noire la forme mature complex-glycosylée.

Afin de montrer que les résultats obtenus ne sont pas dûs à la détection de l'étiquette HA située en position C-terminale des protéines CFTR sauvage, F508del et modifiées, les expériences d'immunodétection ont été réalisées avec les deux anticorps monoclonaux anti-CFTR, L12B4 et M3A7 [Kartner N. *et al.*, 1992].

Les résultats présentés sur la **FIGURE R28** montrent que le profil d'expression de ces protéines est le même quelque soit l'anticorps utilisé, confirmant que les caractéristiques intrinsèques de ces protéines ne sont le résultat ni de la lignée cellulaire, ni du mode de transfection, ni du plasmide ni même de l'anticorps utilisés.

III. GLYCOSYLATION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES

Le processus de maturation de CFTR se fait par deux étapes de glycosylation sur les asparagines 894 et 900 de la 4^{ème} boucle extracellulaire, entre S7 et S8. Comme nous l'avons vu précédemment, la première a lieu au niveau du RE et correspond à l'ajout de mannoses et la seconde a lieu au niveau de l'appareil de Golgi et correspond à l'ajout de glucides complexes. L'utilisation de l'EndoH et de PNGase F, va nous permettre d'une part de voir si nos protéines CFTR mutées sont glycosylées, et d'autre part de voir quel type de glycosylation celles-ci ont subi.

Pour cela, les protéines sauvage, mutée F508del et modifiées ont été extraites, traitées à l'EndoH et à la PNGase F, séparées sur gel SDS-PAGE à 7% d'acrylamide, électrotransférées sur membrane de nitrocellulose puis révélées par immunodétection avec l'anticorps monoclonal anti-HA.

Les résultats présentés sur la **FIGURE R29** montrent que la forme mature de la protéine sauvage est résistante à l'EndoH mais se retrouve sous forme déglycosylée lorsqu'elle est digérée par la PNGase F. A l'opposé, la protéine CFTR-F508del se retrouve sous forme complètement déglycosylée lorsqu'elle est digérée par les deux enzymes.

En ce qui concerne les protéines mutées, les résultats montrent qu'elles ont un profil de glycosylation comparable à celui de CFTR-F508del (**FIGURE R29**).

Cette observation confirme que toutes nos constructions ont subi la première étape de glycosylation caractéristique du RE mais qu'aucune d'entre elles n'est capable d'atteindre l'appareil de Golgi. En outre, le fait que toutes nos protéines soient glycosylées semble démontrer que celles-ci sont correctement orientées par rapport à la membrane du RE, y compris celles ne possédant plus le S6. En effet, dans notre étude, si la suppression du S6 entraînait un défaut d'orientation par rapport à la membrane plasmique, cette glycosylation ne serait pas possible, car la 4^{ème} boucle extracellulaire, où celle-ci a lieu, ne serait pas dans la lumière du RE mais dans le cytoplasme. Il est donc fort probable que ces protéines soient correctement orientées par rapport à la membrane plasmique.

Résultats

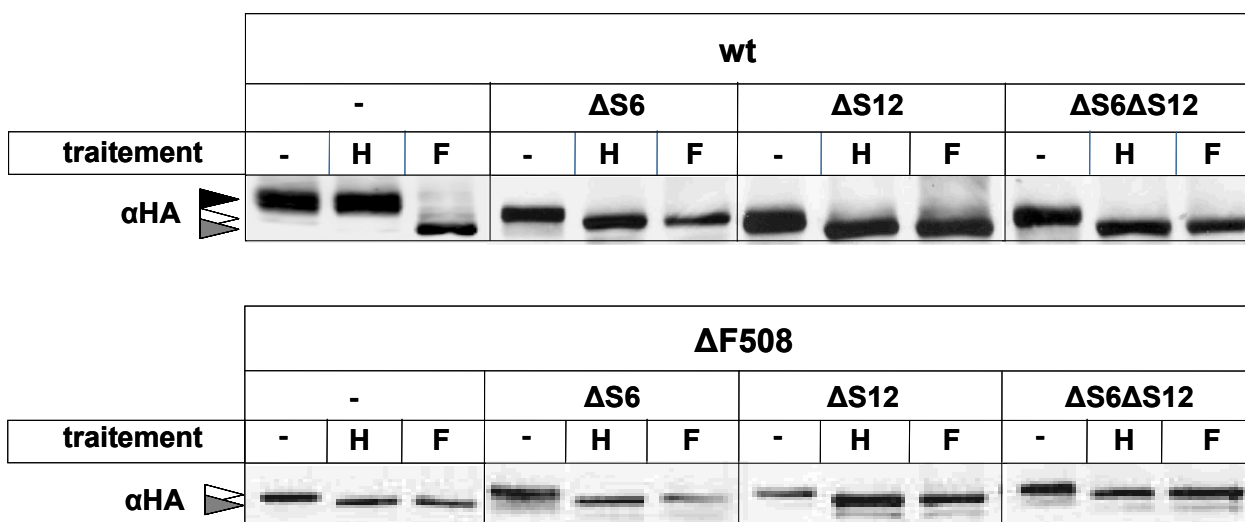


FIGURE R29: Profil de glycosylation des protéines CFTR sauvage (wt), mutées F508del ($\Delta F508$) et modifiées, exprimées stablement dans les cellules BHK-21. Ces protéines ont été digérées soit par l'Endoglycosidase H (H), soit par la PNGase F (F). (–) correspond à la protéine non digérée. Le profil électrophorétique a été déterminé par immunodétection en utilisant l'anticorps anti-HA. La flèche grise représente la forme non glycosylée, la flèche blanche la forme immature core-glycosylée et la flèche noire la forme mature complex-glycosylée.

Cependant, l'étude du profil de glycosylation de ces protéines pour contrôler leur orientation par rapport à la membrane n'est utilisable que pour les protéines ne possédant plus le S6. Le S12 étant situé après les sites de glycosylation dans la séquence primaire de la protéine, un défaut d'orientation n'affecterait pas ce profil.

IV. ÉTUDE DE LA CONFORMATION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES PAR PROTÉOLYSE MÉNAGÉE

CFTR est une protéine composée de deux domaines transmembranaires, TMD1 et TMD2. Chaque domaine est constitué de 6 segments transmembranaires qui imposent une orientation spécifique à la protéine. Ainsi, la suppression d'un ou de plusieurs segments, par exemple S6 et/ou S12, pourrait être à l'origine d'une altération de la disposition des domaines intra- et extracellulaires par rapport à la bicouche lipidique.

Ainsi, en cas de suppression du S6, les domaines NBD1, NBD2 et R pourraient se retrouver dans la lumière du RE au lieu d'être dans le cytoplasme (**FIGURE R30**). De même, la suppression du S12 pourrait entraîner le positionnement du NBD2 dans la lumière du RE et la suppression à la fois du S6 et du S12 positionnerait NBD1 et R à l'intérieur de cet organe.

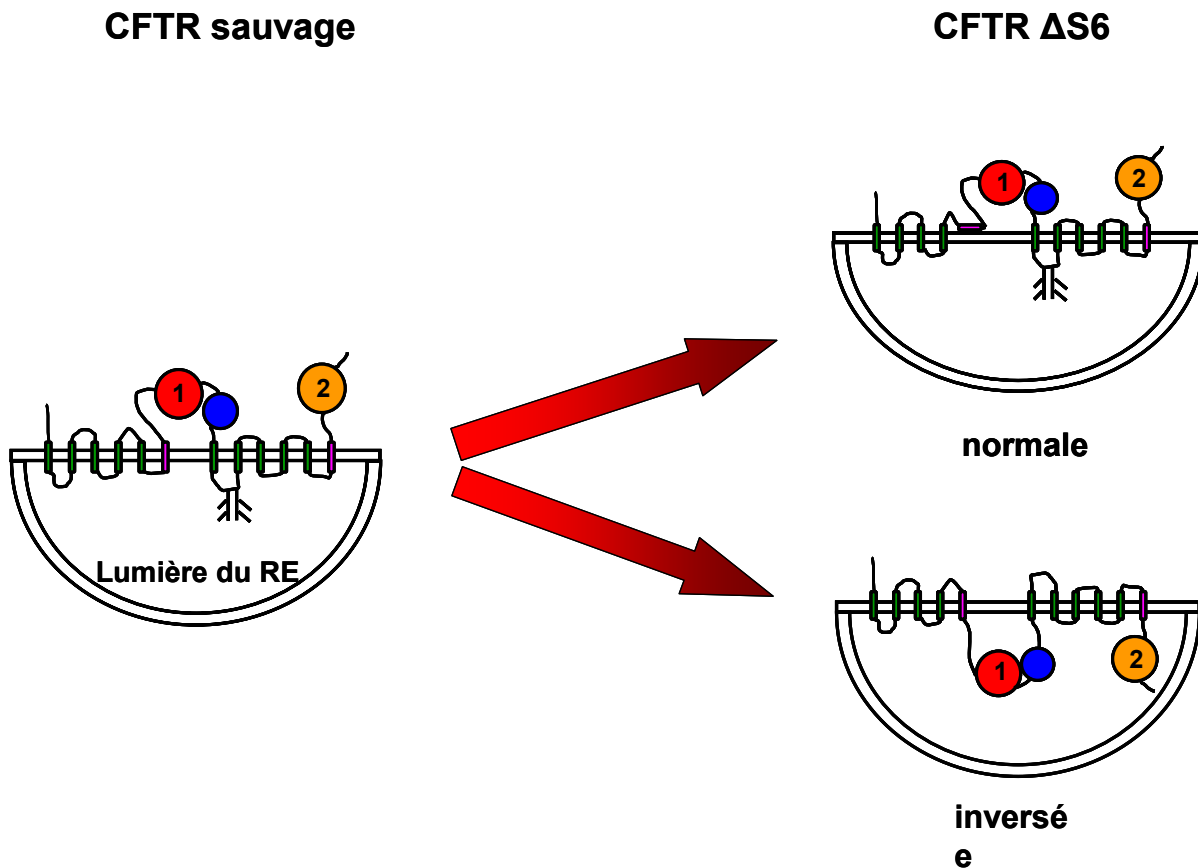


FIGURE R30: Représentation schématique des deux conformations possibles de la protéine CFTR induites par la suppression du segment transmembranaire 6 ($\Delta S6$). Les segments transmembranaires sont représentés en vert, le domaine R en bleu, NBD1 en rouge et NBD2 en orange.

Afin d'évaluer l'impact de la délétion des segments S6 et/ou S12 sur l'orientation de CFTR et de confirmer les suggestions avancées au vu des profils de glycosylation, nous avons réalisé des expériences de protéolyse ménagée à la trypsine sur des microsomes provenant de cellules BHK-21 exprimant de manière stable nos constructions. Ces expériences ont été réalisées en présence et en l'absence de Triton X-100. Cette technique nous a en fait permis de comparer le profil de digestion des protéines mutées à celui de CFTR-F508del, séquestrée comme ces dernières dans le RE.

Avant de procéder à la réalisation de la protéolyse ménagée avec la trypsine, nous avons édité un profil de digestion théorique (**FIGURE R31**). En effet, selon l'orientation des protéines par rapport à la membrane, certains sites sont cachés à l'intérieur de la lumière des microsomes et d'autres sont accessibles. L'ajout de Triton X-100 solubilise la bicouche lipidique et permet à la trypsine d'avoir accès à l'ensemble des sites de coupure. Cette dernière condition nous a servi de contrôle.

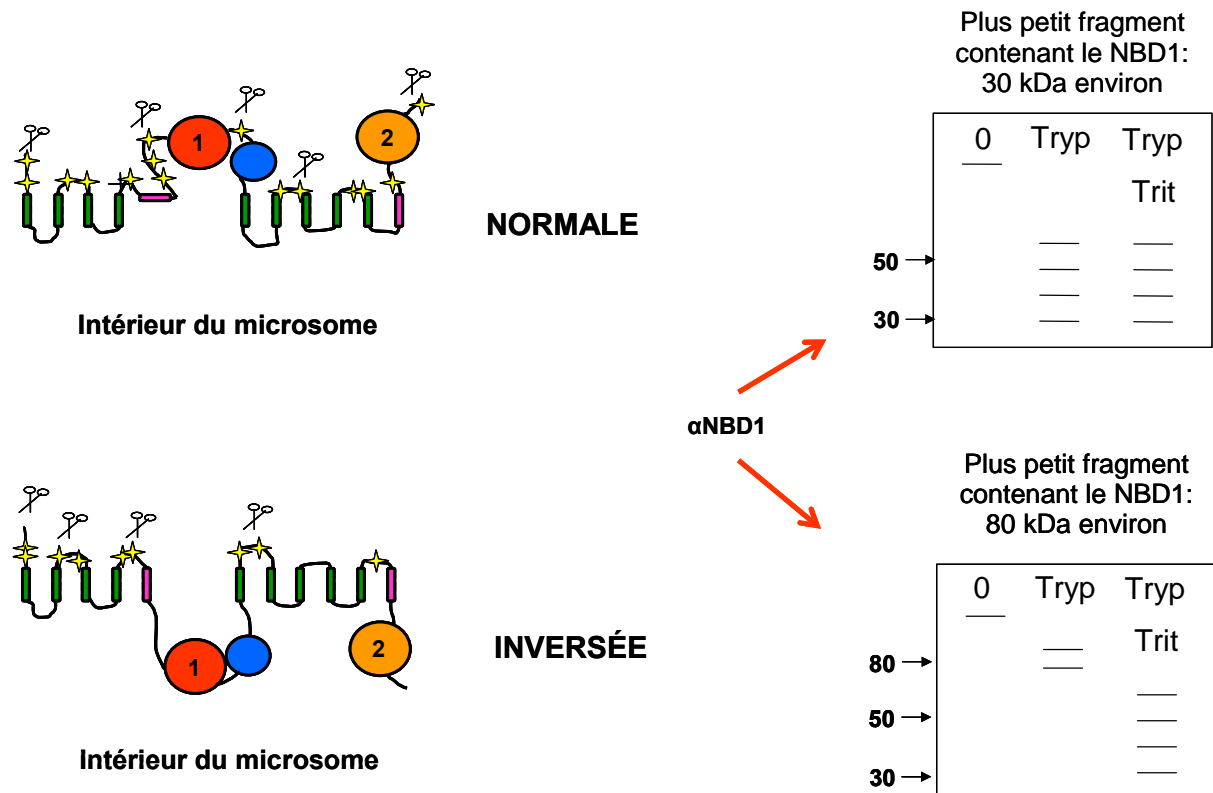


FIGURE R31 : Représentation schématique des profils théoriques de digestion à la trypsine des protéines CFTR mutées ($\Delta S6$, $\Delta S12$ et $\Delta S6/12$). Les segments transmembranaires de CFTR sont représentés en vert, sauf les S6 et S12 qui sont en mauve. R est représenté en bleu, NBD1 en rouge et NBD2 en orange. Tryp représente la trypsine et Trit le Triton X100. La taille des fragments peptidiques obtenus après digestion et détection avec l'anticorps anti-CFTR L12B4 est déterminée en kDa.

Les résultats obtenus sont présentés sur la **FIGURE R32**. Ils montrent que l'ensemble de nos constructions se comporte comme la protéine CFTR-F508del face à la trypsine. Ces résultats confirment donc que la délétion du segment S6 ne modifie pas l'orientation de CFTR par rapport à la membrane du RE. L'ajout de Triton X-100 dans la réaction ne modifie pas le profil de digestion observé pour nos protéines, confirmant ainsi que l'ensemble des domaines hydrophiles de CFTR est disponible pour la digestion à la trypsine et donc que les protéines sont correctement orientées.

Résultats

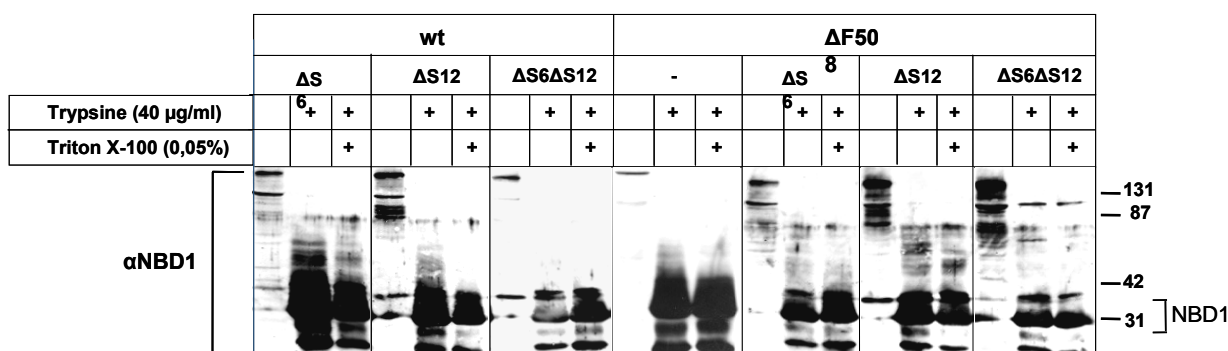


FIGURE R32 : Profil de digestion à la trypsine des protéines CFTR-F508del et modifiées exprimées stablement dans les cellules BHK-21. Les différentes protéines mutées ont été digérées par de la trypsine à 40 μ g/mL en présence ou en absence de 0,05% de Triton X-100. Le profil électrophorétique des peptides a été déterminé par immunodétection en utilisant l'anticorps anti-CFTR L12B4 après migration sur gel SDS-Page à 11% d'acrylamide et électrotransfert.

V. LOCALISATION DES PROTÉINES CFTR MUTÉES

Nous avons observé par immunodétection que toutes les protéines CFTR mutées générées étaient bloquées dans leur forme immature core-glycosylée. Ces résultats ont par la suite été confirmés par l'utilisation d'endoglycosidases. Cependant, différentes études montrent que des protéines retenues dans le RE peuvent se retrouver dans d'autres compartiments intracellulaires encore mal connus [Denning G.M. *et al.*, 1992b ; Lukacs G.L. *et al.*, 1992 ; Biwersi J. & Verkman A.S., 1994]. Pour vérifier cette éventualité pour nos différentes constructions, nous avons réalisé des expériences de co-immunolocalisation.

Pour cela, nous avons exprimé transitoirement des cellules COS-7 à la fois par un gène codant pour un marqueur spécifique du RE (la calreticuline liée à la molécule fluorescente DsRed) et par les gènes codant pour les protéines CFTR sauvage(wt), mutée F508del ($\Delta F508$) ou modifiées. Après 48h d'expression, ces dernières étaient détectées grâce à l'anticorps monoclonal anti-HA couplé à un anticorps secondaire anti-souris fusionné à l'Alexa-488. Le marqueur spécifique du RE était quant à lui détecté par immunofluorescence directe après excitation à 558 nm et émission à 583 nm.

Les résultats présentés sur la **FIGURE R33** montrent que comme attendu, environ 70% de la protéine sauvage sont localisés au niveau du RE (colocalisation de CFTR et du marqueur DsRed), les 30 % restant étant situés à la membrane plasmique. La protéine CFTR-F508del, quant à elle, est totalement localisée dans le RE (co-localisée à 100% avec la protéine DsRed).

En ce qui concerne nos constructions, comme la protéine CFTR-F508del, celles-ci co-localisent toutes avec le marqueur du RE DsRed (**FIGURE R33**). La délétion de S6 et S12 de manière individuelle ou simultanée entraîne donc la séquestration de CFTR dans le RE, tout comme la délétion de la F508.

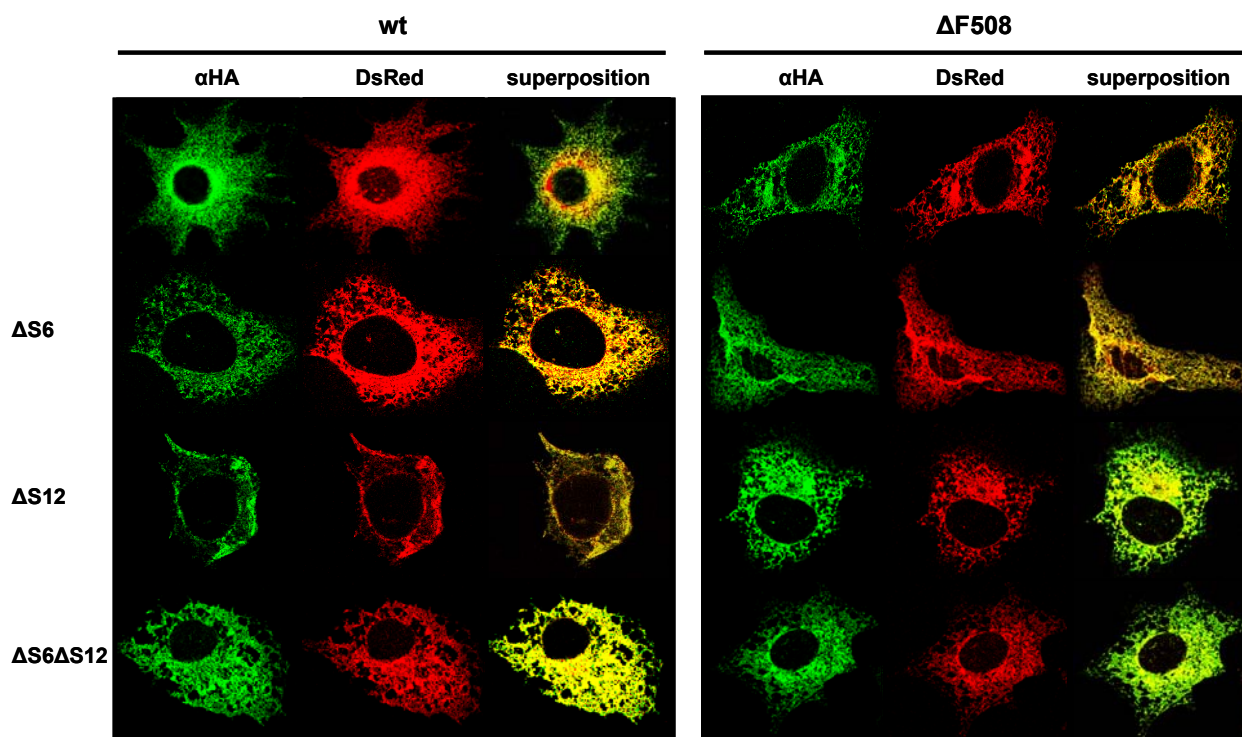


FIGURE R33: Colocalisation des protéines CFTR sauvages (wt), F508del ($\Delta F508$) et mutées ($\Delta S6$, $\Delta S12$ et $\Delta S6\Delta S12$), et du marqueur spécifique du RE, DsRed exprimées transitoirement dans les cellules COS-7. Les protéines CFTR sont détectées avec un anticorps anti-HA et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488 et le marqueur DsRed par fluorescence directe (excitation : 558 nm et émission : 583 nm). Les images ont été prises au microscope confocal à l'aide d'un objectif 63 \times à immersion à huile avec un système Leica TCS SP2 et le logiciel Leica confocal software (Leica, France).

VI. MATURATION ARTIFICIELLE DES PROTÉINES CFTR MUTÉES

Comme nous l'avons vu au cours de la première partie des résultats, la restauration de l'adressage des protéines par abaissement de la température ou par ajout de chaperonnes chimiques semble être un bon indice pour montrer que la cause du mauvais adressage est une altération du repliement de CFTR. L'utilisation de tels procédés permet aux protéines d'échapper à l'ERQC et d'atteindre la surface cellulaire, où il est possible qu'elles soient fonctionnelles.

Résultats

Dans cette partie de notre travail, nous avons donc voulu évaluer le niveau de repliement de nos protéines mutées en observant leur comportement dans des conditions de maturation artificielle.

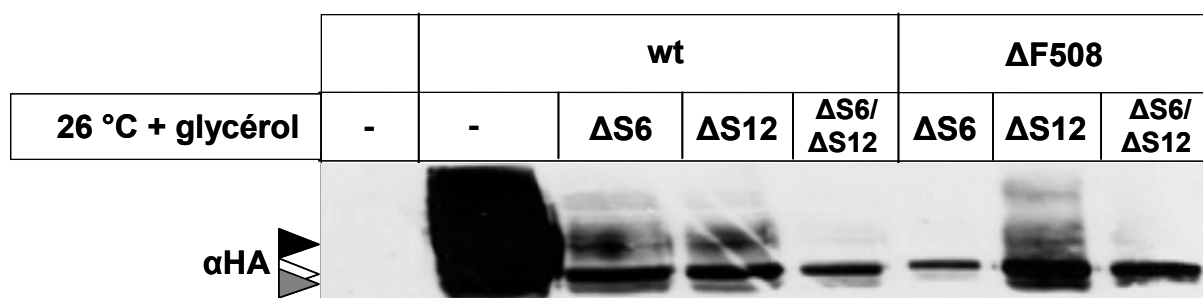


FIGURE R34: Profil d'expression des protéines CFTR sauvage ou F508del délétées des segments transmembranaires 6 et/ou 12 après 12h de traitement avec 10% de glycérol à 26 °C. Le profil électrophorétique des protéines a été déterminé par immunodétection en utilisant l'anticorps anti-HA après séparation sur gel SDS-Page à 7% d'arylamide et électrotransfert sur membrane de nitrocellulose.

Pour cela, les cellules BHK-21 exprimant de manière stable nos protéines CFTR mutées ont été cultivées pendant 12 h à 26°C dans un milieu de culture contenant 10% de glycerol. Les résultats présentés sur la **FIGURE R34** montrent que, comme attendu, le traitement au glycérol à 26°C entraîne une accumulation des formes core- et complex-glycosylées de la protéine sauvage. Concernant nos protéines CFTR mutées, les résultats obtenus sont très hétéroclites. En effet, ce traitement est capable de restaurer la maturation des protéines CFTR ne possédant pas les segments transmembranaires 6 ou 12 (**FIGURE R34**). Cependant, dans les mêmes conditions, cette maturation n'est pas retrouvée lorsque ces deux segments transmembranaires sont supprimés de manière simultanée. Il semble donc y avoir un effet cumulatif lorsque les deux segments sont ôtés, la maturation de CFTR- $\Delta S6\Delta S12$ n'étant pas restaurée par le traitement.

En outre, l'introduction de la mutation F508del dans nos constructions altère la maturation artificielle de CFTR- $\Delta 6$ et celle de CFTR- $\Delta 6/\Delta 12$, mais pas celle de CFTR- $\Delta 12$ (**FIGURE R34**).

VII. CONCLUSION

Dans cette partie de mon travail, j'ai essayé d'apprécier les rôles des TMDs dans les interactions interdomaines nécessaires à la vie cellulaire de CFTR en supprimant S6 et/ou S12.

Nous avons ainsi montré que :

Résultats

- La suppression des segments S6 et S12 de manière individuelle ou simultanée n'altère pas la biosynthèse et la glycosylation de CFTR.
- La suppression des segments S6 et S12 de manière individuelle ou simultanée bloque la maturation de CFTR et entraîne sa séquestration dans le RE.
- La suppression de S6 ne modifie pas l'orientation des domaines cytoplasmiques par rapport à la membrane plasmique.

Discussion

La protéine CFTR, canal Cl⁻ situé à la membrane apicale des cellules épithéliales, est un membre de la superfamille des transporteurs ABC. Elle est ainsi composée de plusieurs domaines : deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD1 et NBD2), deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2) et un domaine R, spécifique, impliqué dans la régulation du canal. Chez les procaryotes, ces domaines sont codés par des gènes individuels et sont exprimés en polypeptides séparés qui doivent interagir puis s'assembler pour donner naissance à une protéine fonctionnelle [Higgins C.F., 1992]. Pour CFTR, bien que les séquences qui codent pour ces domaines soient portées par le même gène, ce processus d'interaction doit aussi avoir lieu pour former un transporteur fonctionnel.

En ce qui concerne la protéine CFTR, il est maintenant clairement établi que l'interaction NBD1-NBD2 est importante pour les phénomènes de fixation et d'hydrolyse d'ATP [Vergani P. *et al.*, 2005a]. De plus, l'analyse de la structure tridimensionnelle à haute résolution de quelques transporteurs ABC connus [Locher K.P. *et al.*, 2002 ; Dawson R.J.P. & Locher K.P., 2006] et du NBD1 de CFTR [Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005] montrent que NBD1 est susceptible d'interagir avec TMD1 par l'intermédiaire d'une région comprenant la F508. Ces résultats ont été confirmés par des études de modélisation suggérant l'importance des interactions entre les NBDs et les TMDs de CFTR [Eudes R. *et al.*, 2005 ; Serohijos A.W.R. *et al.*, 2008]. Les rôles des interactions entre ces différents domaines de la protéine ont surtout été étudiés *in vitro* en utilisant des domaines purifiés [Thomas P.J. *et al.*, 1991 & 1992a ; Ko Y.H. & Pedersen P.L., 1995 ; Qu B.-H. & Thomas P.J., 1996 ; Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005], en analysant l'effet de certaines mutations [Anderson M.P. *et al.*, 1991b ; Gregory R.J. *et al.*, 1991] et en travaillant sur des protéines tronquées [Sheppard D.N. *et al.*, 1994 ; Ostedgaard L.S. *et al.*, 1997 ; Clancy J.P. *et al.*, 1998 ; Devidas S. *et al.*, 1998 ; Cui L. *et al.*, 2007].

Cependant, à ce jour, l'impact *in vivo* de ces interactions interdomaines dans le comportement cellulaire normal de la protéine CFTR entière est très peu connu.

Au cours de ma thèse, nous nous sommes donc attachés à essayer d'évaluer le degré d'implication de chaque domaine dans la biosynthèse, le repliement, la maturation, la localisation, la fonction et la stabilité de CFTR. Pour les domaines NBD1 et NBD2, l'ensemble de ces processus a été abordé. Pour les domaines TMD1 et TMD2, seuls la biosynthèse, le repliement, la maturation, la localisation et l'orientation par rapport à la bicouche lipidique ont été étudiés en supprimant les segments transmembranaires S6 et S12 respectivement.

Pour la réalisation de ce travail, nous avons choisi de déplacer, intervertir ou supprimer des domaines entiers tout en gardant le reste de la protéine intact. Pour cela, nous avons opté pour la méthode de SOE déjà utilisée pour générer des protéines chimériques SUR1-SUR2A [D'Hahan N. *et al.*, 1999, Moreau C. *et al.*, 2000]. De plus, cette méthode est envisageable pour les transporteurs de la superfamille ABC, puisque chaque domaine forme un module indépendant [Croop J.M., 1998].

Le principal avantage de la technique de SOE est de ne modifier que la partie d'intérêt du gène, sans toucher au reste de la séquence [Horton R.M. *et al.*, 1989 ; Warrens A.N. *et al.*, 1997]. Ainsi, cette approche, évite d'introduire de nouveaux sites de restriction correspondant à de nouvelles séquences, qui peuvent influencer le comportement normal de la protéine. En outre, si nous avons choisi de supprimer chacun des domaines par digestion simple à l'aide d'enzymes de restriction dont les sites étaient déjà présents dans le gène, les suppressions auraient touché une région beaucoup plus grande que le domaine visé, et il aurait été impossible de déterminer si les phénomènes observés étaient dus à la seule suppression du domaine ou à celle des régions flanquantes.

Par la suite, afin d'étudier le comportement cellulaire des différentes protéines CFTR créées, nous les avons exprimées transitoirement et stablement dans les cellules COS7 et BHK-21, respectivement. Cette procédure nous a permis de vérifier que les caractéristiques intrinsèques de chaque construction n'étaient pas dues au plasmide (pcDNA3.1, pNUT), à l'agent de transfection (FuGene-6, calcium-phosphate) ou aux cellules (COS-7, BHK-21) utilisées. Les lignées stables, ont été générées grâce au plasmide pNUT, qui nous a permis d'éviter les clones faux-positifs obtenus auparavant avec le plasmide pcDNA3.1 et son agent de sélection le G418. Avec le plasmide pNUT et son agent de sélection le Méthotrexate, nous avons obtenu environ 100% de cellules qui expriment nos différentes constructions. Cependant, nous avons constaté qu'il existe une variation du niveau d'expression entre les différentes lignées cellulaires générées. Malgré cette différence, nous n'avons pas réalisé de clonage cellulaire et nous avons choisi de travailler avec un mélange de clones pour éviter la variation d'expression, mais aussi de comportement, qui peuvent exister entre les clones. Ce procédé avait déjà été utilisé pour exprimer de manière stable CFTR dans les cellules BHK-21 [Tabcharani J.A. *et al.*, 1991 ; Haardt M. *et al.*, 1999].

Au cours de ma thèse, j'ai abordé, à travers l'étude de protéines CFTR modifiées, les rôles des interactions interdomaines, principalement celles impliquant NBD1 et NBD2. Pour plus de facilité, la suite de ma discussion sera présentée en deux chapitres qui reprennent les deux volets de la section Résultats.

I. LES DOMAINES NBD1 et NBD2

Notre travail est le premier à explorer les rôles *in vivo* des domaines NBDs dans le comportement cellulaire de la protéine CFTR entière.

En effet, à ce jour, la majorité des études réalisées sur les NBDs l'ont été soit *in vitro* [Thomas P.J. *et al.*, 1991 & 1992a ; Ko Y.H. & Pedersen P.L., 1995 ; Qu B.-H. & Thomas P.J., 1996 ; Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005], soit sur des protéines CFTR possédant des mutations ponctuelles [Gregory R.J. *et al.*, 1991] ou tronquées [Sheppard D.N. *et al.*, 1994 ; Clancy J.P. *et al.*, 1998 ; Devidas S. *et al.*, 1998 ; Cui L. *et al.*, 2007]. Deux autres études ont aussi abordé les rôles *in vivo* des domaines NBDs, soit après avoir modifié le gène de CFTR pour introduire des sites de restriction pour inverser ou supprimer les NBDs [Pollet J.-F. *et al.*, 2000], soit, récemment, après avoir tronqué la protéine CFTR de son domaine NBD2 et de sa partie C-terminale [Cui L. *et al.*, 2007].

Dans nos constructions, aucune séquence n'a été introduite et aucune partie de CFTR, autre que les NBDs, n'a été supprimée.

Nous avons dans un premier temps étudié l'expression basale, la glycosylation et la localisation cellulaire de nos différentes protéines. Ainsi, par immunodétection, nous avons montré que la suppression, la permutation ou le remplacement de chacun des deux NBDs n'altère pas l'expression de la protéine CFTR, détectée par trois anticorps monoclonaux dirigés contre trois antigènes, localisés dans trois régions différentes de CFTR [Kartner N. *et al.*, 1992 ; Haardt M., *et al.*, 1999]. Ce résultat n'est pas étonnant puisque des études ont montré que des suppressions de plus de la moitié de CFTR [Ko Y.H. & Pedersen P.L., 1995 ; Clancy J.P. *et al.*, 1998 ; Devidas S. *et al.*, 1998] ainsi que le dédoublement d'une partie de CFTR [Pollet J.-F. *et al.*, 2000] ne modifient pas l'expression de la protéine.

Ainsi, supprimer, déplacer ou intervertir les NBDs ne constitue pas une mutation de **classe I** du gène *CFTR* [Welsh M.J. & Smith A.E., 1993].

L'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-CFTR M3A7, dirigé contre un épitope localisé à la fin de NBD2 [Kartner N. *et al.*, 1992], nous a permis de vérifier la suppression de ce domaine. En effet, lorsque NBD2 est supprimé ou déplacé, l'épitope reconnu par cet anticorps, constitué de 31 acides aminés, se trouve scindé en deux régions. 18 acides aminés sont absents ou situés au niveau de NBD1, et 13 acides aminés restent à leur position d'origine, juste après le NBD2 qui ne sont pas suffisants pour être reconnus par l'anticorps.

Par rapport à la protéine CFTR sauvage, nos protéines modifiées montrent différents niveaux d'expression qui peuvent être interprétés comme un défaut de synthèse inhérent, par

exemple, à l'instabilité de l'ARNm [Welsh M.J. & Smith A.E., 1993 ; Duguépéroux I. & De Braekeleer M., 2005]. Cependant, l'analyse de la biosynthèse par marquage métabolique au S^{35} montre que, malgré une différence par rapport à la protéine CFTR sauvage, nos constructions ne présentent pas de défaut de synthèse. En effet, la différence observée vient du fait que les cellules BHK-21 exprimant de manière stable le gène codant pour CFTR sauvage sont toutes issues d'un clone sélectionné pour son expression en quantité relativement importante. Par contre, les cellules BHK-21 transfectées de manière stable par les gènes codant pour nos protéines CFTR modifiées constituent un mélange de cellules exprimant celles-ci à différents niveaux. D'ailleurs l'expression transitoire dans les cellules COS-7 de CFTR sauvage et modifiées montre qu'il n'y a pas de différence dans le processus de biosynthèse.

Cependant, Le profil électrophorétique des différentes constructions montre que seule $N_{1/-}$ atteint la forme mature complex-glycosylée. Les autres sont bloquées dans une forme immature de CFTR caractéristique du RE. Ces résultats ont été confirmés par digestion avec des endoglycosidases et par localisation cellulaire. Ceci montre que NBD1 est suffisant pour assurer la maturation de CFTR. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux décrits dans la littérature [Pollet J.-F. *et al.*, 2000 ; Cui L. *et al.*, 2007]. De manière plus intéressante, l'introduction de la mutation F508del dans la protéine $N_{1/-}$ ($N_{1*/-}$) abolit le processus de maturation, confirmant ainsi l'importance de la F508 dans le trafic RE-Golgi. Ceci suggère aussi que la maturation de CFTR est le résultat d'interactions entre NBD1 et les TMDs voir même entre NBD1 et les boucles cytoplasmiques, comme suggéré précédemment [Cotten J.F. *et al.*, 1996 ; Serohijos A.W.R. *et al.*, 2008]. Nos résultats suggèrent aussi que l'interaction impliquerait préférentiellement NBD1 et TMD1, puisque le changement de position de NBD1 dans la protéine $N_{1/-}$ pour donner $N_{-/1}$ engendre une protéine core-glycosylée incapable de quitter le RE. Ce résultat est en accord avec ce qui est reporté dans la littérature [Kleizen B. *et al.*, 2005 ; Thibodeau P.H. *et al.*, 2005 ; Cui L. *et al.*, 2007]. Ce résultat est aussi confirmé par la construction $N_{2/1}$, dans laquelle les deux domaines ont été permutés, suggérant que la position de NBD1 est très critique pour CFTR. Lorsque NBD1 est remplacé par NBD2 ($N_{2/2}$), un domaine peu homologue (29%) au NBD1 mais qui répond à la définition d'un domaine NBD, la protéine CFTR reste bloquée dans le RE. Ce résultat confirme aussi que la présence de F508 est très importante pour ce processus.

C'est, à notre connaissance, la première fois que la notion de position d'un domaine au sein de la protéine est abordée pour expliquer un phénomène aussi important que la maturation de CFTR. $N_{1/-}$ étant capable de maturer, il semblerait aussi que l'interaction

NBD1-NBD2, bien qu'importante pour la fonction de CFTR [Vergani P. *et al.*, 2005a], n'intervienne pas dans ce phénomène, contrairement à ce qu'avaient avancé Du et collaborateurs [Du K. *et al.*, 2005].

De plus, la présence d'un deuxième NBD1 à la place de NBD2 (N_{1/1}) a tendance à déstabiliser la protéine CFTR. Un NBD1 intact et à sa position initiale, unique ou accompagné de NBD2, permet la maturation de CFTR, ce qui n'est plus le cas lorsqu'il est accompagné d'un autre NBD1.

Le fait que les protéines N_{2/2}, N_{-/2}, N_{2/1}, N_{2/-}, N_{-/1} et N_{1*/-} aient un profil similaire à CFTR-F508del laisse penser que les modifications apportées au gène *CFTR* appartiennent à la **classe II** de mutation [Welsh M.J. & Smith A.E., 1993 ; Haardt M. *et al.*, 1999].

Seule la protéine N_{1/-} est donc capable de maturer et d'atteindre la membrane plasmique comme le confirment les expériences d'immunolocalisation sur cellules non perméabilisées.

Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Cui et collaborateurs, qui ont montré qu'une protéine CFTR tronquée de 232 résidus (1248X) est capable d'atteindre la membrane plasmique [Cui L. *et al.*, 2007]. La présence de NBD2 ne semble donc pas être nécessaire à la localisation intracellulaire de CFTR, alors que celle d'un NBD1 intact à sa position initiale est obligatoire pour ce phénomène.

Nous avons vu que la protéine N_{1/-} est capable d'atteindre la membrane plasmique et est donc potentiellement fonctionnelle. Cependant ni la technique d'efflux d'iodures, ni celle de patch-clamp nous ont permis de détecter une activité canal Cl⁻ dépendante de l'AMPc.

Les mêmes techniques ont aussi été utilisées pour vérifier que les autres protéines qui restent bloquées dans le RE ne présentent pas le phénomène de fuite vers la membrane plasmique déjà observé pour la protéine CFTR-F508del, elle-même bloquée dans le RE [Ward C.L. & Kopito R.R., 1994 ; Gilbert A. *et al.*, 1998 ; Kälén N. *et al.*, 1999]. Cependant, ceci implique que ces protéines peuvent potentiellement être fonctionnelles comme l'est CFTR-F508del [Pasyk E.A. & Foskett J.K., 1995]. Les résultats obtenus nous ont permis de trancher quant à l'absence de fuite vers la membrane mais nous ne nous ont pas permis de conclure sur la fonction qui reste à déterminer.

Cependant, un moyen préliminaire pour savoir si ces protéines sont potentiellement fonctionnelles est d'étudier leur capacité à fixer l'ATP. En effet, toutes les protéines bloquées dans le RE, de même que la protéine N_{1/-}, exprimée au niveau de la membrane plasmique, ont la capacité d'être précipitées par une colonne ATP-agarose, au même titre que les protéines sauvage et mutée F508del. Ceci démontre qu'une protéine CFTR ne possédant qu'un seul NBD, peu importe lequel, est capable de lier l'ATP. Ceci est en accord avec les nombreuses

études montrant que des NBDs purifiés et des protéines CFTR tronquées sont capables de lier ce nucléotide [Sheppard D.N. *et al.*, 1994 ; Ko Y.H. & Pedersen P.L., 1995 ; Devidas S. *et al.*, 1998 ; Yue H. *et al.*, 2000 ; Cui L. *et al.*, 2007]. Contrairement à ce qui a été observé pour le processus de maturation de CFTR, la notion de position du domaine dans la protéine entière n'intervient pas dans la fixation de l'ATP, puisque quelque soit sa position, chaque NBD fixe l'ATP. En outre, ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la F508 n'intervient pas dans la fixation d'ATP, puisque N₁_Δ fixe l'ATP [Lewis H.A. *et al.*, 2004 & 2005]. Il est bien décrit que chaque NBD de CFTR a un rôle particulier et fixe l'ATP avec une affinité différente [Carson M.R. *et al.*, 1995 ; Aleksandrov L. *et al.*, 2001 & 2002 ; Berger A.L. *et al.*, 2005a ; Zhou Z. *et al.*, 2006]. Notre expérience, bien que qualitative et pas quantitative ne nous permet pas d'observer de différences dans l'affinité de nos différentes constructions pour l'ATP. De même, il nous est impossible de voir si la présence d'un deuxième NBD dans la protéine influence la fixation d'ATP. L'ensemble de nos constructions gardant la capacité à lier l'ATP, il serait très intéressant d'étudier leur capacité à l'hydrolyser.

Cependant, l'absence de courant Cl⁻ avec N₁_Δ montre que malgré la fixation de l'ATP au niveau de NBD1, la présence de NBD2 est importante pour la fonction canal Cl⁻ de CFTR. Ce résultat, bien qu'en adéquation avec ce qu'avait montré l'équipe de Jacobs par efflux d'iodures [Pollet J.-F. *et al.*, 2000], est contraire à ce qu'a récemment montré l'équipe de Riordan en utilisant le patch-clamp en configuration canal isolé [Cui L. *et al.*, 2007].

Cette différence dans les résultats pourrait s'expliquer par le fait que dans notre construction N₁_Δ, nous avons gardé la partie C-terminale connue pour être importante pour la fonction de CFTR *via* le motif DTRL [Raghuram V. *et al.*, 2001 ; Benharouga M. *et al.*, 2003]. Dans le travail de l'équipe de Riordan, cette partie ainsi que le NBD2 (232 résidus) ont été supprimés [Cui L. *et al.*, 2007]. Il se pourrait que la protéine obtenue par le groupe de Riordan (CFTR-1248X) forme un dimère à la membrane plasmique pour restaurer la fonction. Dans notre cas, la présence de la partie C-terminale de la protéine empêche cette dimerisation en absence de NBD2 et donc aucune fonction n'est détectée. Cette hypothèse est fortement étayée par l'étude de Sheppard et collaborateurs, qui ont montré que des protéines CFTR tronquées au niveau du domaine R, D836X, étaient capables de former un canal chlorure fonctionnel par dimérisation [Sheppard D.N. *et al.*, 1994]. Cependant, il est aussi possible que l'absence de fonction de N₁_Δ soit due au fait que l'énergie produite par l'hydrolyse d'ATP au niveau de NBD1 n'est pas suffisante pour drainer les ions Cl⁻ vers le milieu extracellulaire [Berger A.L. *et al.*, 2005a ; Stratford F.L. *et al.*, 2007], d'autant plus qu'il a été reporté que NBD1 possède une faible activité ATPasique [Aleksandrov L. *et al.*, 2002].

Le domaine NBD2, bien qu'il ne soit pas nécessaire à la maturation de CFTR, est indispensable à sa fonction, possiblement par l'interaction que ce domaine réalise avec NBD1 pour faciliter l'hydrolyse d'ATP [Vergani P. *et al.*, 2005a]. La délétion du domaine NBD2 du gène *CFTR* semble être une mutation appartenant à la **classe IV** [Welsh M.J. & Smith A.E., 1993 ; Haardt M. *et al.*, 1999]. Cette classe regroupe des mutations altérant l'activité canal Cl⁻ au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales, et sa particularité est que celles-ci touchent en général les segments transmembranaires. La délétion du NBD2 semble donc être unique dans cette classe de mutations.

Nos études de maturation des différentes protéines CFTR par marquage métabolique au S³⁵ ont confirmé que la majorité des constructions, N_{2/2}, N_{-/2}, N_{2/1}, N_{2/-}, N_{-/1} et N_{1*/}, sont incapables de maturer. En outre, la durée de vie de leur forme immature est comparable à celle de la protéine CFTR-F508del, soit environ 45 min. Ceci confirme que ces protéines possèdent des mutations de **classe II** de *CFTR* [Welsh M.J. & Smith A.E., 1993]. Or de nombreuses études ont montré que la protéine CFTR-F508del, qui appartient à cette classe de mutations, possédait un défaut de repliement qui entraîne sa reconnaissance par l'ERQC et sa dégradation rapide au niveau du RE [Denning G.M. *et al.*, 1992a ; Thomas P.J. *et al.*, 1992b ; Thomas P.J. & Pedersen P.L., 1993 ; Ward C.L. & Kopito R.R., 1994 ; Zhang F. *et al.*, 1998]. Le même défaut a été mis en évidence par thermoaggrégation chez nos protéines. En effet, leur température moyenne de thermoaggrégation est proche de celle de CFTR-F508del, 70°C, alors que celle de la protéine sauvage est proche de 86°C. Les protéines N_{2/2}, N_{-/2}, N_{2/1}, N_{2/-}, N_{-/1} et N_{1*/} doivent donc être séquestrées dans le RE car elles sont reconnues comme mal repliées par le système ERQC. Le mauvais repliement de ces protéines a aussi été confirmé par maturation artificielle à 26°C en présence de glycérol. En effet, ce genre de traitement est connu pour stabiliser la conformation des protéines et faciliter leur repliement [Gekko K. & Morikawa T., 1981 ; Sawano H. *et al.*, 1992 ; Denning G.M. *et al.*, 1992a ; Sharma M. *et al.*, 2001]. Il est cependant nécessaire de réaliser des expériences de déglycosylation à l'Endo H et à la PNGase F pour confirmer l'apparition de la forme complex-glycosylée. En effet, l'abaissement de la température à 26°C inhibe les systèmes de dégradation, ce qui peut engendrer l'accumulation de formes polyubiquitylées qui peuvent être interprétées comme des formes matures.

La maturation artificielle, si elle est confirmée, permettrait de débloquent les protéines modifiées séquestrées au niveau du RE et leur permettre d'atteindre la membrane plasmique. Par conséquent il serait possible d'étudier leur fonction par efflux d'iodures et/ou patch-clamp après traitement. Il serait ainsi possible de préciser si c'est le domaine NBD2 seul ou si c'est

l'interaction entre NBD1 et NBD2 qui est nécessaire à la fonction comme il a été reporté récemment [Vergani P. *et al.*, 2005a].

De l'ensemble de nos protéines CFTR modifiées, seule N_{1/-} était capable de maturer. Cependant, son processus de maturation, même s'il est aussi efficace que celui de la protéine sauvage, semble être légèrement retardé. En effet, la forme mature de N_{1/-} n'apparaît qu'au bout d'1 h de chasse, alors que celle de la protéine sauvage apparaît au bout de 30 min seulement. Ce phénomène n'avait pas été détecté dans le travail de Cui et collaborateurs qui ont étudié une protéine CFTR tronquée (1248X) [Cui L. *et al.*, 2007]. NBD2, bien qu'inutile pour l'efficacité du processus de maturation, semble quand même avoir un rôle dans son déroulement, puisque son absence retarde ce phénomène. C'est la première fois qu'un tel rôle est attribué au domaine NBD2 alors que l'ensemble des études réalisées à ce jour avançait le contraire [Pollet J.-F. *et al.*, 2000 ; Du K. *et al.*, 2005 ; Cui L. *et al.*, 2007]. Il n'est cependant pas exclu que l'implication de NBD2 dans le processus de maturation soit due aux interactions que celui-ci peut avoir avec les protéines chaperonnes impliquées dans le repliement. En l'absence de ce domaine, il n'y aurait donc pas d'interactions et ce processus serait retardé.

Le marquage métabolique au S³⁵ nous a aussi permis de constater que la forme mature d'une protéine CFTR ne possédant pas NBD2 est très instable, avec une demi-vie de seulement 2 h contre 17 h pour la protéine sauvage. La présence de NBD2 semble donc être nécessaire à la stabilité de CFTR à la membrane plasmique. Ce résultat est en contradiction avec ce qui a été présenté par Cui et collaborateurs. Ceux-ci ont en effet montré que la protéine CFTR-1248X, privée de ses domaines NBD2 et C-terminal, possède une forme mature aussi stable que celle de la protéine sauvage [Cui L. *et al.*, 2007]. La différence de taille entre nos résultats et ceux de Cui pourrait s'expliquer par le fait que leur construction, contrairement à la notre, ne possède pas la partie C-terminale de la protéine. En effet, comme nous l'avons abordé plus tôt dans ce travail, il est connu depuis longtemps que la partie C-terminale de CFTR est très importante sa stabilité, et les mutations identifiées dans cette région constituent la **classe VI** [Haardt M. *et al.*, 1999]. Cette région est notamment impliquée dans des interactions, *via* son motif DTRL, avec des protéines PDZ [Hall R.A. *et al.*, 1998 ; Short D.B. *et al.*, 1998 ; Wang S. *et al.*, 2000 ; Cheng J. *et al.*, 2002 ; Benharouga M. *et al.*, 2003 ; Hegedüs T. *et al.*, 2003] et peut être séparée en trois parties dans lesquelles les mutations peuvent avoir des effets totalement opposés sur le comportement de CFTR [Gentsch M. & Riordan J.R., 2001]. Parmi les motifs importants contenus dans ce domaine de la protéine, il existe un motif de type YXXΦ impliqué dans l'endocytose puis la

dégradation de CFTR [Prince L.S. *et al.*, 1999; Peter K. *et al.*, 2002]. Il est donc possible que l'absence de ce motif dans la construction de Cui [Cui L. *et al.*, 2007] mais pas dans la notre soit à l'origine des différences observées.

Il est aussi très surprenant de remarquer qu'une protéine CFTR dont le domaine NBD2 a été supprimé appartienne à la même classe de mutations que celles dont la partie C-terminale a été éliminée [Haardt M. *et al.*, 1999]. On constate que lorsque NBD2 ou la partie C-terminale de CFTR est supprimé, la protéine mature est instable au niveau de la membrane plasmique [notre étude ; Haardt M. *et al.*, 2001 ; Benharouga M. *et al.*, 2001], alors que si les deux sont supprimés en même temps, la protéine se comporte comme CFTR sauvage [Cui L. *et al.*, 2007]. Il est donc légitiment envisageable que la stabilité membranaire de CFTR repose sur l'interaction entre le domaine NBD2 et la partie C-terminale.

Cette observation que l'absence de NBD2 provoque une perte de stabilité de la forme mature de CFTR est de premier ordre. En effet, la majorité des études réalisées jusqu'alors a montré qu'à part son importance dans le transport des ions chlorures, le domaine NBD2 possède un rôle négligeable voir perturbateur dans les processus de repliement et de stabilité de la protéine CFTR [Zhang F. *et al.*, 1998 ; Pollet J.-F. *et al.*, 2000 ; Du K. *et al.*, 2005 ; Kleizen B. *et al.*, 2006 ; Cui L. *et al.*, 2007]. C'est donc la première fois qu'est démontré un rôle majeur de ce domaine dans le comportement intracellulaire de la protéine CFTR.

Nous avons aussi constaté que le remplacement de NBD2 par NBD1 (N_{1/1}) entraîne le blocage de CFTR au niveau du RE sous sa forme immature avec une demi-vie (environ 6 h) 8 fois supérieure à celle de la protéine CFTR sauvage ou mutée F508del (environ 45min). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. La première est le dédoublement de motifs RXR impliqués dans la séquestration et le retour dans le RE de certaines protéines [Zerangue N. *et al.*, 1999]. En effet, la protéine CFTR possède 4 motifs de type RXR au niveau de sa séquence primaire [Riordan, 1989]. Deux de ces motifs, ⁵¹⁶RYR⁵¹⁸ et ⁵⁵³RAR⁵⁵⁵, sont situés au niveau de NBD1 et sont masqués lorsque CFTR se trouve dans sa conformation native. Ceux-ci sont cependant accessibles lorsque la protéine est mal repliée, comme dans le cas de la protéine CFTR-F508del séquestrée dans le RE [Chen E.Y.J. *et al.*, 2000 ; Chang X.-B. *et al.*, 1999 ; Hegedüs T. *et al.*, 2006]. Ces deux motifs doivent donc être masqués lorsque NBD1 à sa position initiale n'est pas muté F508del car ce domaine doit interagir avec TMD1. Par contre, il est probable que ces motifs présents dans le deuxième NBD1 soient à découvert car NBD1 ne peut pas interagir avec TMD1 via la F508, ce qui entraîne la séquestration de N_{1/1} dans le RE.

Ainsi, l'augmentation de la demi-vie de la protéine $N_{1/1}$ pourrait s'expliquer par le fait qu'elle existe sous la forme de deux populations séquestrées dans le RE : une forme B, correspondant aux 70% de CFTR incapables de maturer et rapidement dégradés, et une forme B', correspondant aux 30% capables de maturer, plus stables, mais séquestrés dans le RE par la présence des deux motifs RXR supplémentaires. Un bon moyen de prouver cette hypothèse serait de muter ces deux sites supplémentaires et de voir si la protéine est alors capable de quitter le RE et d'atteindre la forme mature complex-glycosylée.

Dans tous les cas, que ce soit pour $N_{1/-}$, pour $N_{1/1}$ ou pour le reste de nos constructions, le problème sous-jacent pourrait être le niveau de repliement qui ne répondrait pas aux critères du système ERQC.

Cependant, l'utilisation de la méthode de thermoaggrégation, qui permet d'étudier indirectement le repliement global et qui avait déjà utilisée pour caractériser le repliement de CFTR-F508del [Sharma M. *et al.*, 2001], montre que, par rapport aux protéines CFTR sauvage et mutée F508del, seule la protéine $N_{1/-}$ ne présente pas de défaut de repliement. Pour la protéine $N_{1/1}$, les résultats obtenus ne permettent pas de trancher. En effet, la température moyenne d'agrégation de $N_{1/1}$ (75°C) est bien supérieure à celle de F508del (70°C), mais reste inférieure à celle de la protéine sauvage (86°C).

Il existe cependant une limite à cette méthode. Celle-ci étant réalisée sur des extraits protéiques totaux, il n'est pas impossible que d'autres protéines interviennent dans le processus de dénaturation thermique de CFTR. Afin de limiter ce phénomène, il serait envisageable de réaliser les mêmes expériences sur des protéines CFTR immunoprécipitées.

Le fait que le degré de repliement global de la protéine $N_{1/-}$ est très proche de celui de la protéine CFTR sauvage, nous a énormément surpris. Pour vérifier ce résultat, et confirmer celui de $N_{1/1}$, nous avons donc utilisé la méthode de thermostabilité, déjà décrite pour CFTR [Benharouga M., *et al.*, 2001 ; Sharma M. *et al.*, 2001]. Des périodes de chasse après marquage métabolique au S^{35} ont ainsi été réalisées à 26°C, température facilitant le repliement et stabilisant la conformation des protéines [Gekko K. & Morikawa T., 1981 ; Sawano H. *et al.*, 1992], à 37°C, température physiologique, et à 40°C, température à laquelle les protéines mal repliées sont dénaturées et rapidement dégradées [Parsell D.A. & Lindquist S., 1993 ; Benharouga M., *et al.*, 2001 ; Sharma M. *et al.*, 2001].

Nous pouvons d'abord constater qu'à 40°C, $N_{1/1}$ subit une déstabilisation plus importante que la protéine sauvage et $N_{1/-}$, confirmant la présence d'un défaut de repliement mineur de cette protéine. Il est possible que $N_{1/1}$ soit bloquée sous la forme d'un intermédiaire de repliement thermosensible de CFTR. En effet, Sharma et collaborateurs ont montré qu'une

protéine CFTR-F508del restaurée à la membrane plasmique possédait une conformation plus proche de celle de la protéine sauvage que de celle de CFTR-F508del bloquée dans le RE [Sharma M. *et al.*, 2001]. Dans ce cas là, le niveau final de repliement de CFTR serait atteint au niveau de la membrane plasmique.

Les résultats obtenus par thermoaggrégation et par thermostabilité ont aussi été confirmés par l'utilisation d'une troisième méthode, la protéolyse ménagée. Cette méthode utilisée depuis longtemps pour évaluer le niveau de repliement des protéines [Zettlmeissl G. *et al.*, 1983] est basée sur l'accessibilité ou non de sites de digestion pour des endopeptidases au niveau d'une protéine ayant une conformation donnée. Malgré la confirmation des résultats précédemment obtenus, il existe cependant quelques différences entre les profils de trypsinolyse de N_{1/-}, de N_{1/1} et de la protéine sauvage. En effet, aux plus fortes concentrations de trypsine, 500 et 1000 µg/mL, les peptides dont le poids moléculaire est supérieur à 40 kDa semblent beaucoup moins résistants dans N_{1/-} et N_{1/1} que dans CFTR sauvage. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce résultat est qu'il existe une différence entre la conformation de N_{1/-} et N_{1/1} et CFTR sauvage. Ceci était attendu pour N_{1/1} mais pas pour N_{1/-}. N_{1/-} étant présente à la membrane plasmique, le niveau de repliement de ces deux protéines est suffisant pour être reconnu par l'ERQC et être exporté par le RE, à la différence que N_{1/1} possède des domaines RXR supplémentaires. Cependant, l'équipe de Lukacs a montré que les différences de conformation entre CFTR sauvage et mutée F508del étaient beaucoup plus évidentes si l'anticorps utilisé pour l'immunodétection était l'anti-CFTR M3A7 plutôt que l'anti-CFTR L12B4, la partie N-terminale de la protéine semblant être beaucoup plus stable que la partie C-terminale [Du K. *et al.*, 2005]. Si nous avons utilisé cet anticorps, il nous aurait peut-être été possible de détecter de plus grandes différences de conformation entre N_{1/-} et N_{1/1} et la protéine sauvage. Or dans les protéines N_{1/-} et N_{1/1}, l'épitope reconnu par l'anticorps M3A7 a été supprimé, et nous n'avons donc pas pu utiliser cet anticorps pour contrôler le niveau de conformation de nos protéines. Ainsi, l'utilisation de ces trois méthodes nous a donc confirmé que le domaine NBD2 n'était pas nécessaire au repliement de CFTR, comme avancé par Cui et collaborateurs [Cui L. *et al.*, 2007]. En outre, la perte de stabilité de la forme mature de N_{1/-} ne semble donc pas être due à un défaut de structure de la protéine, comme c'est le cas pour la protéine CFTR-F508del exprimée au niveau de la membrane plasmique et pour la protéine CFTR-T70 [Benharouga M. *et al.* 2001 ; Sharma M. *et al.*, 2001].

La présence d'un domaine NBD1 intact à sa position native est indispensable au repliement correct de la protéine CFTR, puisque la thermoaggrégation montre que la majorité des autres protéines modifiées sont mal repliées. Il est donc très probable que le point critique

du repliement de CFTR soit une interaction entre NBD1 et TMD1 *via* la F508. Ce résultat est contraire à ce qu'avait suggéré l'équipe de Lukacs qui prônait l'interaction NBD1-NBD2 [Du K. *et al.*, 2005], mais est en accord avec les conclusions de nombreuses autres études [Kleizen B. *et al.*, 2004; Du K. *et al.*, 2005 ; Thibodeau P.H. *et al.*, 2005 ; Cui L. *et al.*, 2007].

II. LES SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES S6 ET S12

Le deuxième volet de mon travail est une étude préliminaire sur l'importance de TMD1 et TMD2 dans le comportement de CFTR. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux segments S6 et S12 appartenant respectivement à TMD1 et à TMD2.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi de supprimer S6 et S12 sachant que, probablement, par rapport à la structure prédite de CFTR, cela pourrait altérer l'orientation de CFTR. Cependant par l'intermédiaire de ces constructions, nous avons aussi voulu apporter une réponse quant à la position de S6 vis-à-vis de la bicouche lipidique. En effet, ce segment présente trois charges, et selon le travail de Tector et Hartl, ces charges sont suffisantes pour le déstabiliser et l'empêcher de s'insérer à la membrane [Tector M. & Hartl F.U., 1999].

Les résultats obtenus sont formels : la suppression individuelle ou simultanée de S6 et S12 n'altère pas la biosynthèse et l'insertion au niveau de la bicouche lipidique de la protéine CFTR. De manière plus intéressante, la suppression de S6 ne perturbe pas l'orientation de CFTR, comme le montrent les résultats obtenus par déglycosylation à l'Endo H et à la PNGase F. En effet, la glycosylation caractéristique du RE, sensible à l'endo H et à la PNGase F, est présente dans toutes nos constructions, ce qui appuie l'existence d'une orientation correcte permettant à la boucle extracellulaire 4 (EL4) d'être en contact avec les glycosyltransférases présentes dans la lumière de RE. Les résultats obtenus par protéolyse à la trypsine en absence ou en présence de Triton X-100 ont confirmé cela. Cette méthode est couramment utilisée pour étudier l'orientation et l'insertion des protéines transmembranaires [Gerber G.E. *et al.*, 1977]. Nous avons aussi montré que la présence ou l'absence de la F508 n'influençait aucun de ces processus. Ce résultat confirme la nécessité d'avoir ces segments pour voir l'influence de F508 sur la maturation de CFTR, ce qui suggère qu'une interaction est possible entre ces segments et NBD1. Nos constructions ne sont en outre pas capables de quitter le RE où elles sont séquestrées comme le montrent les résultats d'immunocolocalisation avec le DsRed, marqueur spécifique de ce compartiment. Ainsi, supprimer les segments transmembranaires S6 et/ou S12 est une mutation appartenant à la **classe II** [Welsh M.J. & Smith A.E., 1993 ; Haardt M. *et al.*, 1999].

Le fait que la protéine CFTR privée de son segment S6 soit correctement orientée dans la membrane est en accord avec les résultats obtenus par Tector et Hartl. En effet, ces derniers ont montré que le S6 était instable, et qu'il n'était peut être pas transmembranaire mais pseudomembranaire [Tector M. & Hartl F.U., 1999]. De plus, ce segment, qui possède trois charges, doit être «aidés» par les domaines le flanquant pour s'insérer correctement dans la membrane [Lu Y. *et al.*, 1998]. S6 étant suivi par NBD1, un domaine soluble, il ne doit donc pas être «aidé» et reste pseudomembranaire. Pour le segment S12, l'orientation du domaine NBD2 n'a pas été démontrée après sa suppression. Ceci sera étudié prochainement par protéolyse ménagée en présence ou non de Triton X100 et détection des peptides générés par l'anticorps anti-CFTR M3A7.

CFTR reste associé au RE en l'absence de S6 alors qu'il est bien orienté par rapport à la bicouche lipidique. Ceci nous permet de suggérer légitimement que ce segment est impliqué dans le repliement de la protéine CFTR. En effet, il a déjà été montré que des mutations ponctuelles des segments transmembranaires pouvaient altérer le repliement et la maturation de CFTR [Choi M.Y. *et al.*, 2005]. Cette implication du S6 dans le repliement et la maturation de CFTR pourrait s'expliquer par son implication dans l'interaction TMD1 et NBD1 et/ou TMD1 et TMD2. Cependant, notre étude ne nous permet pas de déterminer dans laquelle de ces deux interactions S6 est impliquée. Cependant, des études ont montré que TMD1 et TMD2 interagissaient entre eux par l'intermédiaire de S6 et S12 [Ostedgaard L.S. *et al.*, 1997 ; Chen E.-Y. *et al.*, 2004], il est donc fort probable que ces segments soient impliqués dans le «packing» des TMDs, important pour le repliement de la protéine. En effet, après qu'ait eu lieu l'interaction entre NBD1 et TMD1, TMD1 doit interagir avec TMD2 pour transmettre le signal de repliement, probablement par l'intermédiaire de ces segments [Kleizen B. *et al.*, 2005 ; Thibodeau P.H. *et al.*, 2005].

Dans le but de confirmer cette hypothèse, il serait très intéressant d'étudier le niveau de repliement des protéines CFTR sauvage, F508del, Δ S6 et Δ S12. En effet, si la suppression de S6 entraîne l'absence d'interaction entre TMD1 et TMD2 mais pas celle entre NBD1 et TMD1, la protéine CFTR- Δ S6 devrait avoir un niveau de repliement supérieur à celui de CFTR-F508del, le blocage ayant lieu à une étape de repliement supérieure à celle dans laquelle est bloquée CFTR-F508del [Kleizen B. *et al.*, 2005 ; Cui L. *et al.*, 2007].

Conclusions & Perspectives

Conclusions & Perspectives

Dans le premier volet de ce travail, nous avons précisé le rôle de chaque NBD dans le comportement cellulaire de la protéine CFTR. Ainsi, nous avons montré que NBD1 dans sa position initiale et en présence de la F508 est nécessaire à la maturation de CFTR.

NBD2, quant à lui, est nécessaire à la fonction et à la stabilité membranaire de CFTR.

En se basant sur le fait que $N_{1/-}$ est capable de maturer mais pas $N_{-/1}$, nous avons avancé l'hypothèse que l'interaction NBD1-TMD1 est nécessaire à la maturation de CFTR. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris par la méthode de SOE l'inversion des domaines TMD1 et TMD2 dans les protéines CFTR sauvage, F508del, $N_{1/-}$, $N_{-/1}$ et $N_{2/1}$ (**TABLEAU C1**). Si cette hypothèse est vérifiée, l'inversion des TMDs provoquerait l'inhibition de la maturation des protéines CFTR sauvage et $N_{1/-}$, et provoquerait éventuellement la maturation de $N_{-/1}$ et $N_{2/1}$.

FIXATION	SÉQUENCE	CONSTRUCTION RÉALISÉE
5'	ccaccgcgggtggcgccgctctagaactag	TM _{2/1}
3'	tagcacaaaaattctccagaaaaa	TM _{2/1}
5'	ttttctggagaattttgtgcta	TM _{2/1}
3'	aaattgccgagtgtctggagttac	TM _{2/1}
5'	gtaaacctccagcactcggcaattt	TM _{2/1}
3'	taccatgtttgtacagcccaggga	TM _{2/1}
5'	cacactcagttaaccaaggtcaga	TM _{2/1}
3'	atagaacataataagctcttggtg	TM _{2/1}
5'	cacaagagcttattatgttctat	TM _{2/1}
3'	atccacatctatgaccgccatgcg	TM _{2/1}
5'	cgcattggcggtcatagatgtggat	TM _{2/1}
3'	atctttcttcacgtgtgaattctc	TM _{2/1}

TABLEAU C1 : Liste des différents oligonucléotides, chimériques ou non, qui seront utilisés pour construire des protéines CFTR avec les TMDs inversés par la technique de SOE.

Il est connu que la fonction de CFTR est optimale lorsque les deux NBDs interagissent [Vergani P. *et al.*, 2005a]. Ceci pourrait donc expliquer que $N_{1/-}$, qui atteint la membrane plasmique, est non fonctionnelle. Cependant, la raison pour laquelle cette protéine est instable à la membrane plasmique reste inconnue. Nous avons proposé plusieurs hypothèses qu'il reste à tester :

- nous avons proposé que ce défaut de stabilité puisse être dû à un défaut de dimérisation de CFTR à la membrane plasmique. En effet, Ramjeesingh et collaborateurs ont montré que CFTR était présente sous forme de dimère à la membrane plasmique [Ramjeesingh M. *et al.*, 2003]. Il se pourrait que cette dimérisation soit responsable de la stabilité de la protéine à cet endroit et que celle-ci soit inhibée par la suppression de NBD2. La dimérisation de la protéine $N_{1/-}$ sera

étudiée par la méthode décrite par l'équipe de Bear en utilisant le PFO (acide perfluoro-octanoïque) comme détergeant pour l'extraction [Ramjeesingh M. *et al.*, 1999 & 2003].

- nous avons proposé que la stabilité de la protéine CFTR à la membrane plasmique puisse être due à des interactions intramoléculaires, en particulier entre le domaine NBD2 et la partie C-terminale. Cette hypothèse sera vérifiée en étudiant la stabilité de N1/- co-transfectée avec un domaine NBD2 unique.

- il est possible que la stabilité de la membrane plasmique de CFTR soit due à des interactions avec d'autres protéines par l'intermédiaire du domaine NBD2. Des expériences de co-immunoprécipitations de protéines connues seront réalisées sur les protéines CFTR sauvage et N1/- afin de distinguer les protéines incapables de se lier à N1/-.

Par SOE, en plus des 8 constructions étudiées en détail dans ce travail, nous avons généré 5 autres protéines CFTR modifiées possédant des NBDs inversés, déplacés ou supprimés. Chacune de ces 5 protéines possédaient au moins un NBD1 muté F508del. Des expériences préliminaires d'immunodétection de ces protéines extraites à partir de cellules COS-7 transfectées transitoirement ont été réalisées et ont montré qu'aucune d'entre elles n'est capable de maturer. Il serait intéressant d'étudier plus en détail ces constructions, en particulier la stabilité de leur forme immature, afin de voir si certaines d'entre elles se comportent comme N1/1, qui possède un phénotype cellulaire très particulier, voir unique.

Une autre perspective à ce travail serait d'étudier les processus d'internalisation et de dégradation à la membrane plasmique de N1/-. En effet, à travers cette étude, nous pouvons dégager une meilleure compréhension des phénomènes responsables de la dégradation rapide au niveau de la membrane plasmique d'une protéine correctement repliée.

Cette étude a montré l'importance des interactions interdomaines pour la maturation et la stabilité de CFTR, en particulier l'interaction NBD1-TMD1. L'interaction NBD1-NBD2 est cependant très bien décrite [Vergani P. *et al.*, 2005a]. Nous avons donc envisagé d'étudier des mutations, retrouvées chez des malades n'ayant pas de pronostic morbide et présente dans la même protéine que la F508del, capables de restaurer le phénotype de cette dernière. 15 mutations ont ainsi été identifiées (**TABLEAU C2**). L'ensemble de ces mutations a été généré par mutagenèse dirigée. Les études préliminaires sont envisagées pour bientôt.

Le deuxième volet de ce travail a porté sur l'interaction NBD1-TMD1 nécessaire à la maturation de CFTR. Cette étude a été réalisée à travers l'observation de protéines CFTR

délestées de leur segment transmembranaire S6, ainsi que de son correspondant dans TMD2, S12. Cette étude a montré que malgré la suppression de leur segment transmembranaire, les domaines cytoplasmiques sont correctement orientés par rapport à la bicouche lipidique. De plus, il semblerait que les segments S6 et S12 soient nécessaires à la maturation de CFTR.

FIXATION	SÉQUENCE	CONSTRUCTION RÉALISÉE
5'	ccaccgcggtggcgccgctctagaactag	S _{12/6}
3'	tatgcactaatcaaagttggtattatcctg	S _{12/6}
5'	caggataataccaactttgattagtgcata	S _{12/6}
3'	gtgtaaactccagcactcggaattccc	S _{12/6}
5'	gggaaattgccgagtctggagtttacagc	S _{12/6}
3'	taccatgtttgtacagcccaggga	S _{12/6}
5'	cacactcagttaaccaaggtcaga	S _{12/6}
3'	gaaggagaaggaaggaatcatcctccgg	S _{12/6}
5'	ccggaggatgattcctcttccttccttc	S _{12/6}
3'	ctgcgcattggcggtcatagatgtggatagc	S _{12/6}
5'	gctatccacatctatgaccgccatgcgcag	S _{12/6}
3'	atctttcttcacgtgtgaattctc	S _{12/6}

TABLEAU C2 : Liste des différents oligonucléotides, chimériques ou non, qui seront utilisés pour construire des protéines CFTR avec les S6 et S12 inversés par la technique de SOE.

Cependant, cette étude n'est pas complète. En effet, aucune expérience ne confirme que le domaine NBD2 est correctement orienté par rapport à la membrane plasmique. Ceci est très important car Tector et Hartl ont montré que S6 était instable [Tector M. & Hartl F.U., 1999], mais sans donner de détail sur le S12.

Pour démontrer l'orientation de NBD2 dans le cas des suppressions de segments transmembranaires, il faudrait réaliser les mêmes expériences de protéolyse ménagée en présence ou en l'absence de Triton X100, mais en détectant les peptides obtenus par l'anticorps anti-CFTR M3A7, reconnaissant une partie de domaine NBD2.

Il reste aussi à préciser si l'absence de maturation de protéines CFTR sans S6 et/ou S12 est due à la suppression de l'interaction NBD1-TMDs ou alors à la suppression de l'interaction TMD1-TMD2. En effet, le modèle de Kleizen et collaborateurs propose que le processus de maturation se déroule de la manière suivante : TMD1 est synthétisé, puis NBD1 qui va alors interagir avec ce domaine. TMD2 est alors synthétisé, puis interagit avec TMD1 [Kleizen B. *et al.*, 2005]. De plus, des expériences de pontage chimique ont montré que TMD1 et TMD2 interagissaient entre eux par l'intermédiaire de S6 et S12 [Chen E.Y. *et al.*, 2004]. Pour démontrer cette hypothèse, nous avons généré des protéines CFTR dans lesquelles S6 et S12 sont inversés. Si c'est l'interaction TMD1-TMD2 qui est rompue en cas de suppression de S6 ou S12, il est possible qu'une protéine CFTR possédant ces segments transmembranaires inversés soit capable de maturer.

Conclusions & Perspectives

D'une manière générale, à travers notre étude nous avons essayé de comprendre le rôle de chaque domaine NBD. Au delà de la protéine CFTR, notre étude permet aussi de dégager les conclusions pour des protéines appartenant à la même famille que CFTR : ABCC.

En l'absence de toute structure cristallographique à haute résolution pour CFTR, l'étude des relations structure/fonction reste un moyen privilégié pour comprendre l'impact de certaines mutations responsables d'un défaut de repliement de CFTR et par conséquent envisager d'une manière plus spécifique, avec des molécules chimiques pré-designées, leur correction.

Bibliographie

1. **Aguilar-Bryan L., Nichols C.G., Wechsler S.W., Clement J.P. 4th, Boyd A.E. 3rd, Gonzalez G., Herrera-Sosa H., Nguy K., Bryan J., Nelson D.A.** (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268(5209): 423-6.
2. **Ahner A. & Brodsky J.L.** (2004) Checkpoints in ER-associated degradation: excuse-me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol.* 14: 474-478.
3. **Akabas M.H., Kaufmann C., Cook T.A., Archdeacon P.** (1994) Amino acid residues lining the chloride channel of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 269(21):14865-8.
4. **Akabas M.H., Cheung M., Guinamard R.** (1997) Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29(5):453-63.
5. **Akabas M.H.** (2000) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J. Biol. Chem.* 275(6): 3729-3732.
6. **Aleksandrov L., Mengos A., Chang X.-B., Aleksandrov A.A., Riordan J.R.** (2001) Differential interactions of nucleotides at the two nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 276(16): 12918-12923.
7. **Aleksandrov L., Aleksandrov A.A., Chang X.-B., Riordan J.R.** (2002) The first nucleotide binding domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a site of stable nucleotide interaction, whereas the second is a site of rapid turnover. *J. Biol. Chem.* 277(18): 15419-15425.
8. **Allikmets R., Singh N., Sun H., Shroyer N.F., Hutchinson A., Chidambaram A., Gerrard B., Baird L., Stauffer D., Peiffer A., Rattner A., Smallwood P., Li Y., Anderson K.L., Lewis R.A., Nathans J., Leppert M., Dean M., Lupski JR.** (1997) A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* 15(3): 236-246.
9. **Ambudkar S.V., Kim I.W., Xia D., Sauna Z.E.** (2006) The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett.* 580(4): 1049-55.
10. **Ameen N., Silvis M., Bradbury N.A.** (2007) Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. *J. Cys. Fibros.* 6(1): 1-14.

11. **Andersen D.H.** (1938) Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. *Am. J. Dis. Child* 56: 344.
12. **Andersen D.H. & Hodges R.G.** (1946) Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of the ethiology. *Am. J. Dis. Child* 72: 62-80.
13. **Anderson C.M., Allan J., Johansen P.G.** (1967) Comments on the possible existence and nature of a heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Bibl. Paediatr.* 86: 381-387.
14. **Anderson M.P., Rich D.P., Gregory R.J., Smith A.E., Welsh M.J.** (1991a) Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251(4994):679-82.
15. **Anderson M.P., Gregory R.J., Thompson S., Souza D.W., Paul S., Mulligan R.C., Smith A.E., Welsh M.J.** (1991b) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253(5016):202-5.
16. **Anderson M.P., Berger H.A., Rich D.P., Gregory R.J., Smith A.E., Welsh M.J.** (1991c) Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 67(4):775-84.
17. **Aridor M., Bannykh S.I., Rowe T., Balch W.E.** (1995) Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Cell Biol.* 131(4): 875-893.
18. **Baker J.M.R., Hudson R.P., Kanelis V., Choy W.Y., Thibodeau P.H., Thomas P.J., Forman-Kay J.D.** (2007) CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(8):738-45.
19. **Banales J.M., Prieto J., Medina J.F.** (2006) Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World J. Gastroenterol.* 12(22): 3496-3511.
20. **Bannykh S.I., Bannykh G.I., Fish K.N., Moyer B.D., Riordan J.R., Balch W.E.** (2000) Traffic pattern of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early exocytic pathway. *Traffic* vol. 1, n°11: 852-870.
21. **Barasch J., Kiss B., Prince A., Saiman L., Gruenert D., al-Awqati Q.** (1991) Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352(6330): 70-73.
22. **Bear C.E., Duguay F., Naismith A.L., Kartner N., Hanrahan J.W., Riordan J.R.** (1991) Cl⁻ channel activity in xenopus oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J. Biol. Chem.* 266(29): 19142-19145.

23. **Bear C.E., Li C.H., Kartner N., Bridges R.J., Jensen T.J., Ramjeeasingh M., Riordan J.R.** (1992) Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68(4):809-18.
24. **Bebök Z., Mazzochi C., King S.A., Hong J.S., Sorscher E.J.** (1998) The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J. Biol. Chem.* 273(45): 29873-29878.
25. **Becq F., Fanjul M., Merten M., Figarella C., Holland E., Gola M.** (1993) Possible regulation of CFTR-chloride channels by membrane-bound phosphatases in pancreatic duct cells. *FEBS Let.* 327(3): 37-342.
26. **Becq F., Jensen T.H., Chang X.-B., Savoia A., Rommens J.M., Tsui L.-C., Buchwald M., Riordan J.R., Hanrahan J.W.** (1994) Phosphatase inhibitors activate normal and defective CFTR chloride channels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91(19): 9160-9164.
27. **Benharouga M., Lipecka J., Fanen P., Baudoin-Legros M., Banting G., Fritsch J., Edelman A.** (1996) Properties of a Cl(-)-conductive pathway(s) in microsomes from rat kidney inner medulla. Involvement of cystic fibrosis transmembrane regulator protein. *Eur. J. Biochem.* 240(1): 268-273.
28. **Benharouga M., Fritsch J., Banting G., Edelman A.** (1997) Properties of chloride-conductive pathways in rat kidney cortical and outer-medulla brush-border membranes--inhibition by anti-(cystic fibrosis transmembrane regulator) mAbs. *Eur. J. Biochem.* 246(2): 367-372.
29. **Benharouga M., Haardt M., Kartner N., Lukacs G.L.** (2001) COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J. Cell Biol.* vol. 153, n°5: 957-970.
30. **Benharouga M., Sharma M., So J., Haardt M., Drzymala L., Popov M., Schwapach B., Grinstein S., Du K., Lukacs G.L.** (2003) The role of the C terminus and Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor in the functional expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in nonpolarized cells and epithelia. *J. Biol. Chem.* 278(24): 22079-22089.
31. **Berdiev B.K., Prat A.G., Cantiello H.F., Ausiello D.A., Fuller C.M., Jovov B., Benos D.J., Ismailov I.I.** (1996) Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments. *J. Biol. Chem.* 271(30): 17704-17710.

32. **Berdiev B.K., Cormet-Boyaka E., Tousson A., Qadri Y.J., Oosterveld-Hut H.M.J., Hong J.S., Gonzales P.A., Fuller C.M., Sorscher E.J., Lukacs G.L., Benos D.J.** (2007) Molecular proximity of CFTR and ENaC assessed by fluorescence resonance energy transfer . *J. Biol. Chem.* 282(50): 36481-36488.
33. **Berger A.L., Ikuma M., Welsh M.J.** (2005a) Normal gating CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102(2): 455-460.
34. **Berger H.A. & Welsh M.J.** (1991) Electrolyte transport in the lungs. *Hosp. Pract. (Off Ed)* 26(3): 53-59.
35. **Berger H.A., Travis S.M., Welsh M.J.** (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 268(3): 2037-2047.
36. **Bertrand C.A. & Frizzell R.A.** (2003) The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285: C1-C18.
37. **Bilan F., Thoreau V., Nacfer M., Dérand R., Norez C., Cantereau A., Garcia M., Becq F., Kitzis A.** (2004) Syntaxin 8 impairs trafficking of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and inhibits its channel activity. *J. Cell. Sci.* 117(Pt 10): 1923-1935.
38. **Biwersi, J., & Verkman A.S.** (1994) Functional CFTR in the endosomal compartment of CFTR-expressing fibroblasts and T84 cells. *Am. J. Physiol.* 266(*Cell Physiol.* 35): C149-C156.
39. **Biwersi J., Emans N., Verkman A.S.** (1996) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation stimulates endosome fusion in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93(22): 12484-12489.
40. **Bossard F., Robay A., Toumaniantz G., Dahimene S., Becq F., Merot J., Gauthier C.** (2007) NHE-RF1 protein rescues DeltaF508-CFTR function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292(5): L1085-L1094.
41. **Boucher R.C., Stutts M.J., Knowles M.R., Cantley L., Gatzky J.T.** (1986) Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J. Clin. Invest.* 78(5): 1245-1252.
42. **Bradbury N.A., Cohn J.A., Venglarik C.J., Bridges R.J.** (1994) Biochemical and biophysical identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels as components of endocytic clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* 269(11): 8296-8302.

43. **Brodsky J.L.** (2001) Chaperoning the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281: L39-L42.
44. **Brown C.R., Hong-Brown L.Q., Bowers J., Vermin A.S., Welch W.J.** (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* 1:117-125.
45. **Burkhart B., Elkaer M.L., Kwon T.H., Racz G.Z., Varga G., Steward M.C., Nielsen S.** (2003) Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut.* 52(7): 1008-16.
46. **Cahill P., Nason M.W.Jr, Ambrose C., Yao T.Y., Thomas P., Egan M.E.** (2000) Identification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator domains that are important for interactions with ROMK2. *J. Biol. Chem.* 275(22): 16697-16701.
47. **Callebaut I., Eudes R., Mornon J.-P., Lehn P.** (2004) Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modelling of the heterodimer. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 230-242.
48. **Campbell J.D., Proks P., Lippiat J.D., Sansom M.S.P., Ashcroft F.M.** (2004) Identification of a functionally important negatively charged residue within the second catalytic site of the SUR1 nucleotide-binding domains. *Diabetes* 53(suppl. 3): S123-S127.
49. **Cannon C.L., Kowalski M.P., Stopak K.S., Pier G.B.** (2003) Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 29(2): 188-197.
50. **Cantiello H.F.** (1996) Role of the actin cytoskeleton in the regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp. Physiol.* 81(3): 505-514.
51. **Carson M.R., Travis S.M., Welsh M.J.** (1995) The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J. Biol. Chem.* 270(4): 1711-1717.
52. **Chabot H., Vives M.F., Dagenais A., Grygorczyk C., Berthiaume Y., Grygorczyk R.** (1999) Downregulation of epithelial sodium channel (ENaC) by CFTR co-expressed in xenopus oocytes is independent of Cl⁻ conductance. *J. Membr. Biol.* 169(3): 175-188.
53. **Chan K.W., Csanády L., Seto-Young D., Nairn A.C., Gadsby D.C.** (2000) Severed molecules functionally define the boundaries of the cystic fibrosis transmembrane

- conductance regulator's NH₂-terminal nucleotide binding domain. *J. Gen. Physiol.* 116: 163-180.
54. **Chang X.-B., Tabcharani J.A., Hou Y.X., Jensen T.J., Kartner N., Alon N., Hanrahan J.W., Riordan J.R.** (1993) Protein kinase A (PKA) still activates CFTR chloride channel after mutagenesis of all 10 PKA consensus phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 268(15):11304-11.
 55. **Chang X.-B., Cui L., Hou Y.-X., Jensen T.J., Aleksandrov A.A., Mengos A., Riordan J.R.** (1999) Removal of multiple arginine-framed trafficking signals overcomes misprocessing of $\Delta F508$ CFTR present in most patients with cystic fibrosis. *Mol. Cell* 4: 137-142.
 56. **Chappe V., Irvine T., Liao J., Evagelidis A., Hanrahan J.W.** (2005) Phosphorylation of CFTR by PKA promotes binding of the regulatory domain. *EMBO J.* 24(15): 2730-2740.
 57. **Chen E.Y.-J., Bartlett M.C., Clarke D.M.** (2000) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator has an altered structure when its maturation is inhibited. *Biochemistry* 39: 3797-3803.
 58. **Chen E.Y., Bartlett M.C., Loo T.W., Clarke D.M.** (2004) The $\Delta F508$ mutation disrupts packing of the transmembrane segments of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 279(38): 39620-39627.
 59. **Chen J.-M., Cutler C., Jacques C., Bœuf G., Denamur E., Lecointre G., Mercier B., Cramb G., Férec C.** (2001) A combined analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: implication for structure and disease models. *Mol. Biol. Evol.* 18(9): 1771-1778.
 60. **Chen W., Helenius J., Braakman I., Helenius A.** (1995) Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc. Natl Am. Sci. USA* vol. 92: 6229-6233.
 61. **Cheng J., Moyer B.D., Milewski M., Loffing J., Ikeda M., Mickle J.E., Cutting G.R. Li M., Stanton B.A., Guggino W.B.** (2002) A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator plasma membrane expression. *J. Biol. Chem.* 277(5): 3520-3529.
 62. **Cheng J., Wang H., Guggino W.B.** (2004) Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J. Biol. Chem.* 279(3): 1892-1898.

63. **Cheng S.H., Gregory R.J., Marshall J., Paul S., Souza D.W., White G.A., O’Riordan C.R., Smith A.E.** (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* vol. 63: 827-834.
64. **Cheng S.H., Fang S.L., Zabner J., Marshall J., Piraino S., Schiavi S.C., Jefferson D.M., Welsh M.J., Smith A.E.** (1995) Functional activation of the cystic fibrosis trafficking mutant delta F508-CFTR by overexpression. *Am. J. Physiol.* 268(4 Pt 1): L615-L624.
65. **Cheung K.H., Leung C.T., Leung G.P., Wong P.Y.** (2003) Synergistic effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and aquaporin-9 in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 68(5): 1505-1510.
66. **Cheung M. & Akabas M.H.** (1996) Identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel-lining residues in and flanking the M6 membrane-spanning segment. *Biophys J.* 70(6):2688-95.
67. **Cheung M. & Akabas M.H.** (1997) Locating the anion-selectivity filter of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel. *J. Gen. Physiol.* 109: 289-299.
68. **Choi J.Y., Muallem D., Kiselyov K., Lee M.G., Thomas P.J., Muallem S.** (2001) Aberrant CFTR dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* 410(6824): 94-97.
69. **Choi M.Y., Partridge A.W., Daniels C., Du K., Lukacs G.L., Deber C.M.** (2005) Destabilization of the transmembrane domain induces misfolding in a phenotypic mutant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 280(6): 4968-4974.
70. **Choo-Kang L.R. & Zeitlin P.L.** (2001) Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281(1): L58-L68.
71. **Clain J., Lehmann-Che J., Dugueperoux I., Arous N., Girodon E., Legendre M., Goossens M., Edelman A., de Braekeler M., Teulon J., Fanen P.** (2005) Misprocessing of the CFTR protein leads to mild cystic fibrosis phenotype. *Hum. Mutat.* 25(4): 360-371.
72. **Clancy J.P., Hong J.S., Bebök Z., King S.A., Demolombe S., Bedwell D.M., Sorscher E.J.** (1998) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) nucleotide-binding domain 1 (NBD-1) and CFTR truncated within NBD-1 target to the epithelial plasma membrane and increase anion permeability. *Biochemistry* 37: 15222-15230.

73. **Clement J.P. 4th, Kunjilwar K., Gonzalez G., Schwanstecher M., Panten U., Aguilar-Bryan L., Bryan J.** (1997) Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* 18(5): 827-838.
74. **Cotten J.F., Ostedgaard L.S., Carson M.R., Welsh M.J.** (1996) Effect of cystic fibrosis-associated mutations in the fourth intracellular loop of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 271(35): 21279-21284.
75. **Crawford L., Maloney P.C., Zeitlin P.L., Guggino W.B., Hyde S.C., Turley H., Gatter K.C., Harris A., Higgins C.F.** (1991) Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88(20): 9262-9266.
76. **Croop J.M.** (1998) Evolutionary relationship among ABC transporters. *Methods Enzymol.* 292: 101-116.
77. **Csanády L., Chan K.W., Nairn A.C. and Gadsby D.C.** (2005) Functional roles of nonconserved structural segments in CFTR's NH₂-terminal nucleotide binding domain, *J. Gen. Physiol.* 125: 43-55.
78. **Cui L., Aleksandrov L., Hou Y.-X., Gentzsch M., Chen J.-H., Riordan J.R., Aleksandrov A.A.** (2006) The role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator phenylalanine 508 side chain in ion channel gating. *J. Physiol.* 572(Pt 2): 347-358.
79. **Cui L., Aleksandrov L., Chang X.-B., Hou Y.-X., He L., Hegedus T., Gentzsch M., Aleksandrov A., Balch W.E., Riordan J.R.** (2007) Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR. *J. Mol. Biol.* 365(4):981-94.
80. **Cyr D.M.** (2005) Arrest of CFTR Δ F508 folding. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* 12(1): 2-3.
81. **D'Hahan N., Jacquet N., Moreau C., Catty P., Vivaudou M.** (1999) A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K⁺ channels by K⁺ channel openers. *Mol. Pharmacol.* vol. 56, n°2: 308-315.
82. **Da T. & Verkman A.S.** (2004) Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45(12): 4477-4483.
83. **Dalemans W., Barbry P., Champigny G., Jallat S., Dott K., Dreyer D., Crystal R.G., Pavirani A., Lecocq J.P., Lazdunski M.** (1991) Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 354(6354): 526-528.
84. **Davis P.B., Drumm M., Konstan M.W.** (1996) Cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154(5):1229-56.

85. **Dawson D.C., Smith S.S., Mansoura M.K.** (1999) CFTR: mechanism of anion conduction. *Physiol. Rev.* 79: S47-S71.
86. **Dawson R.J.P. & Locher K.P.** (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443(7108):180-5.
87. **De Keukeleire B., Micoud J., Biard J., Benharouga M.** (2008) The endoplasmic reticulum-associated degradation of mutant CFTR requires a guanine nucleotide-sensitive step. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* sous presse.
88. **Dean M., Hamon Y., Chimini G.** (2001a) The human ATP-binding cassette (ABC) superfamily. *J. Lip. Res.* vol. 42: 1007-1017.
89. **Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R.** (2001b) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11(7):1156-66.
90. **Dean M.** (2002)
91. **Denning G.M., Anderson M.P., Amara J.F., Marshall J., Smith A.E., Welsh M.J.** (1992a) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358(6389):761-4.
92. **Denning G.M., Ostedgaard L.S., Cheng S.H., Smith A.E., Welsh M.J.** (1992b) Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J. Clin. Invest.* 89(1): 339-349.
93. **Devidas S., Yue H., Guggino W.B.** (1998) The second half of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator forms a functional chloride channel. *J. Biol. Chem.* 273(45): 29373-29380.
94. **Dhani S.U. & Bear C.E.** (2006) Role of intramolecular and intermolecular interactions in ClC channel and transporter function. *Pflügers Arch.* 451(6): 708-715.
95. **Di A., Brown M.E., Deriy L.V., Li C., Szeto F.L., Chen Y., Huang P, Tong J., Naren A.P., Bindokas V., Palfrey H.C., Nelson D.J.** (2006) CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat. Cell Biol.* 8(9): 933-944.
96. **Di Sant'Agnese P.A., Darling R.C., Perera G.A., Shea E.** (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12(5):549-63.
97. **Drumm M.L., Wilkinson D.J., Smit L.S., Worrell R.T., Strong T.V., Frizzell R.A., Dawson D.C., Collins F.S.** (1991) Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254(5039): 1797-1799.

98. **Du K., Sharma M., Lukacs G.L.** (2005) The $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* 12(1): 17-25.
99. **Duguép  roux I & De Braekeleer M.** (2005) The CFTR 3849+10kbC->T and 2789+5G->A alleles are associated with a mild CF phenotype. *Eur. Respir. J.* 25(3):468-73.
100. **Dulhanty A.M. & Riordan J.R.** (1994) A two-domain model for the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator based on sequence similarities. *FEBS Lett.* 343(2):109-14.
101. **Durie P.R., Ahmed N., Corey M., Zielenski J., Ellis E., Tsui L.-C.** (1999) CFTR gene mutations and the pancreatic phenotype. *Pediatr. Pulmonol. Suppl.* 19: 127-128.
102. **Dutzler R., Campbell E.B., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R.** (2002) X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0   reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415(6869):287-94.
103. **Egan M., Flotte T., Afione S., Solow R., Zeitlin P.L., Carter B.J., Guggino W.B.** (1992) Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected insertion of CFTR. *Nature* 358(6387): 581-584.
104. **Egan M.E., Gl  ckner-Pagel J., Ambrose C.A., Cahill P.A., Pappoe L., Balamuth N., Cho E., Canny S., Wagner C.A., Geibel J., Caplan M.J.** (2002) Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of $\Delta F508$ -CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat. Med.* 8(5): 485-492.
105. **Egan M.E., Pearson M., Weiner S.A., Rajendran V., Rubin D., Gl  ckner-Pagel J., Canny S., Du K., Lukacs G.L., Caplan M.J.** (2004) Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* vol. 304: 600-602.
106. **Elgavish A.** (1991) High intracellular pH in CFPAC: a pancreas cell line from a patient with cystic fibrosis is lowered by retrovirus mediated CFTR gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180(1): 342-348.
107. **Ellgaard L. & Helenius A.** (2001) ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. In Cell. Biol.* 13:431-437.
108. **Eudes R., Lehn P., F  rec C., Mornon J.-P., Callebaut I.** (2005) Nucleotide binding domains of human CFTR: a structural classification of critical residues and disease-causing mutations. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 2112-2123.
109. **Farinha C.M., Nogueira P., Mendes F., Penque D., Amaral M.D.** (2002) The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 cochaperone is required

- for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem. J.* 366: 797-806.
110. **Farinha C.M. & Amaral M.D.** (2005) Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol. Cell Biol.* 25(12): 5242-5252.
 111. **Fanconi G., Uehlinger E., Knauer C.** (1936) Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiectasien. *Wiener Klin. Wochen* 86: 753.
 112. **Farber S.** (1945) Some organic digestive disturbances in early life. *J. Mich. State Med. Soc.* 44: 587-594.
 113. **Fischer H., Fukuda N., Barbary P., Ilea B., Sartorial C., Matthay M.A.** (2001) Partial restoration of defective chloride conductance in deltaF508 CF mice by trimethylamine oxide. *Am. J. Physiology. Lung Cell Mol. Physiol.* 281:L52-L57.
 114. **Gabriel S.E., Clarke L.L., Boucher R.C., Stutts M.J.** (1993) CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct protein with a regulatory relationship. *Nature* 363(6426): 263-268.
 115. **Gabriel S.E., Brigman K.N., Koller B.H., Boucher R.C., Stutts M.J.** (1994) Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* 266: 107-109.
 116. **Gadsby D.C. & Nairn A.C.** (1999) Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol. Rev.* 79(1 Suppl): S77-S107.
 117. **Gadsby D.C., Vergani P., Csanady L.** (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440(7083): 477-483.
 118. **Ganeshan R., Di A., Nelson D.J., Quick M.W., Kirk K.L.** (2003) The interaction between syntaxin 1A and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels is mechanistically distinct from syntaxin 1A-SNARE interactions. *J. Biol. Chem.* 278(5): 2876-2885.
 119. **Gekko K. & Morikawa T.** (1981) Thermodynamics of polyol-induced thermal stabilization of chymotrypsinogen. *J. Biochem. (Tokyo)* 90: 51-60.
 120. **Gelman M.S., Kannegaard E.S., Kopito R.R.** (2002) A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 277(14): 11709-11714.

121. **Gentzsch M. & Riordan J.R.** (2001) Localization of sequences within the C-terminal domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator which impact maturation and stability. *J. Biol. Chem.* 276(2): 1291-1298.
122. **Gentzsch M., Aleksandrov A., Aleksandrov L., Riordan J.R.** (2002) Functional analysis of the C-terminal boundary of the second nucleotide binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and structural implications. *Biochem. J.* 366: 541-548.
123. **Gentzsch M., Chang X.B., Cui L., Wu Y., Ozols V.V., Choudhury A., Pagano R.E., Riordan J.R.** (2004) Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol. Biol Cell* 15(6): 2684-2696.
124. **Gerber G.E., Gray C.P., Wildenauer D., Khorana H.G.** (1977) Orientation of bacteriorhodopsin in *Halobacterium halobium* as studied by selective proteolysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 74(12):5426-30.
125. **Gething M.J. & Sambrook J.** (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355(6355): 33-45.
126. **Gilbert A., Jadot M., Leontieva E., Wattiaux-De Coninck S., Wattiaux R.** (1998) Δ F508 CFTR localizes in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in cystic fibrosis cells. *Exp. Cell Research* 242: 144-152.
127. **Goldstein J.L., Sahi J., Bhuva M., Layden T.J., Rao M.C.** (1994) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl^- secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 107: 950-956.
128. **Gregory R.J., Cheng S.H., Rich D.P., Marshall J., Paul S., Hehir K., Ostedgaard L., Klinger K.W., Welsh M.J., Smith A.E.** (1990) Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 347(6291):382-6.
129. **Gregory R.J., Rich D.P., Cheng S.H., Souza D.W., Paul S., Manavalan P., Anderson M.P., Welsh M.J., Smith A.E.** (1991) Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* 11(8): 3886-3893.
130. **Gross C.H., Abdul-Manan N., Fulghum J., Lippke J., Liu X., Prabhakar P., Brennan D., Swope Willis M., Faerman C., Connelly P., Raybuck S., Moore J.** (2006) Nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, an ABC transporter, catalyze adenylate kinase activity but not ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 281(7): 4058-4068.

131. **Guggino W.B.** (2004) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1: 28-32.
132. **Haardt M., Benharouga M., Lechardeur D., Kartner N., Lukacs G.L.** (1999) C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J. Biol. Chem.* 274(31):21873-7.
133. **Haggie P.M., Stanton B.A., Verkman A.S.** (2004) Increased diffusional mobility of CFTR at the plasma membrane after deletion of its C-terminal PDZ binding motif. *J. Biol. Chem.* 279(7): 5494-5500.
134. **Haggie P.M. & Verkman A.S.** (2007) CFTR-independent phagosomal acidification in macrophages. *J. Biol. Chem.* 282(43): 31422-31428.
135. **Hall R.A., Ostedgaard L.S., Premont R.T., Blitzer J.T., Rahman N., Welsh M.J., Lefkowitz R.J.** (1998) A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95(15): 8496-8501.
136. **Hamann S.** (2002) Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int. Rev. Cytol.* 215: 395-431.
137. **Hamman B.D., Chen J.C., Johnson E.E., Johnson A.E.** (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 angstrom during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89: 535-544.
138. **Hammond C., Braakman I., Helenius A.** (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91(3): 913-917.
139. **Hamosh A., Fitzsimmons S.C., Macek M. Jr., Knowles M.R., Rosenstein B.J., Cutting G.R.** (1998) Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J. Pediatr.* 132(2): 255-259.
140. **Hanrahan J.W., Kone Z., Mathews C.J., Luo J., Jia Y., Linsdell P.** (1998) Patch-clamp studies of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Methods Enzymol.* 293: 169-194.
141. **Hartman J., Huang Z., Rado T.A., Peng S., Jilling T., Muccio D.D., Sorscher E.J.** (1992) Recombinant synthesis, purification, and nucleotide binding characteristics of

- the first nucleotide binding domain of the cystic fibrosis gene product. *J. Biol. Chem.* 267(10): 6455-6458.
142. **Hasegawa H., Skach W., Baker O., Calayag M.C., Lingappa V., Verkman AS.** (1992) A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. *Science* 258(5087): 1477-1479.
 143. **Haws C.M., Nepomuceno I.B., Krouse M.E., Wakelee H., Law T., Xia Y., NGuyen H., Wine J.J.** (1996) Delta F508-CFTR channels: kinetics, activation by forskolin, and potentiation by xanthines. *Am. J. Physiol.* 270: C1544-C1555.
 144. **Hebert D.N., Foellmer B., Helenius A.** (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* 81(3): 425-433.
 145. **Hegedüs T., Sessler T., Scott R., Thelin W., Bakos E., Váradi A., Szabó K., Homolya L., Milgram S.L., Sarkadi B.** (2003) C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302: 454-461.
 146. **Hegedüs T., Aleksandrov A., Cui L., Gentzsch M., Chang X.-B., Riordan J.R.** (2006) F508del CFTR with two altered RXR motifs escapes from ER quality control but its channel activity is altered. *Biochem. Biophys. Acta* 1758: 565-572.
 147. **Higgins C.F., Hiles I.D., Salmond G.P., Gill D.R., Downie J.A., Evans I.J., Holland I.B., Gray L., Buckel S.D., Bell A.W., et al.** (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323(6087): 448-50.
 148. **Higgins C.F.** (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:67-113.
 149. **Hogenauer C., Santa Ana C.A., Porter J.L., Millard M., Gelfand A., Rosenblatt R.L., Prestidge C.B., Fordtran J.S.** (2000) Secretion in human carriers of cystic fibrosis mutations: an evaluation of the hypothesis that heterozygotes have subnormal active intestinal chloride secretion. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1422-1427.
 150. **Hollenstein K., Frei D.C., Locher K.P.** (2007) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* 446(7132): 213-216.
 151. **Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R.** (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension, *Gene* 77: 61-68.

152. **Howell L.D., Borchardt R., Kole J., Kaz A.M., Randak C., Cohn J.A.** (2004) Protein kinase A regulates ATP hydrolysis and dimerization by a CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) domain. *Biochem J.* 378: 151-159.
153. **Hu W., Howard M., Lukacs G.L.** (2001) Multiple endocytic signals in the C-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem. J.* 354 (Pt 3): 561-572.
154. **Hwang T.-C., Nagel G., Nairn A.C., Gadsby D.C.** (1994) Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91(11): 4698-4702.
155. **Hwang T.H., Schwiebert E.M., Guggino W.B.** (1996) Apical and basolateral ATP stimulates tracheal epithelial chloride secretion via multiple purinergic receptors. *Am. J. Physiol.* 270(6 Pt 1): C1611-1623.
156. **Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J., Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R., Gallagher M.P., Gill D.R., Hubbard R.E., Higgins C.F.** (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346(6282):362-5.
157. **Inagaki N., Gono T., Clement J.P. 4th, Namba N., Inazawa J., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Seino S., Bryan J.** (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270(5239): 1166-1170.
158. **Jakob C.A., Bodmer D., Spirig U., Battig P., Marcil A., Dignard D., Bergeron J.J., Thomas D.Y., Aebi M.** (2001) Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep.* 2(5): 423-430.
159. **Jarry T.M. & Cheung A.L.** (2006) *Staphylococcus aureus* escapes more efficiently from the phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. *Infect. Immun.* 74(5): 2568-2577.
160. **Jensen T.J., Loo M.A., Pind S., Williams D.B., Goldberg A.L., Riordan J.R.** (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83: 129-135.
161. **Jia Y., Mathews C.J., Hanrahan J.W.** (1997) Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 272(8):4978-84.
162. **Jouret F., Bernard A., Hermans C., Dom G., Terryn S., Leal T., Lebecque P., Cassiman J.J., Scholte B.J., de Jonge H.R., Courtoy P.J., Devuyst O.** (2007)

- Cystic fibrosis is associated with a defect in apical receptor-mediated endocytosis in mouse and human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18(3): 707-718.
163. **Jovov B., Ismailov I.I., Berdiev B.K., Fuller C.M., Sorscher E.J., Dedman J.R., Kaetzel M.A., Benos B.J.** (1995) Interaction between cystic fibrosis conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J. Biol. Chem.* 270(49): 29194-29200.
 164. **Jurkuvenaite A., Varga K., Nowotarski K., Kirk K.L., Sorscher E.J., Li Y., Clancy J.P., Bebök Z., Collawn J.F.** (2005) Mutations in the amino terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhance endocytosis. *J. Biol. Chem.* 281(6): 3329-3334.
 165. **Kartner N., Augustinas O., Jensen T.J., Naismith A.L., Riordan J.R.** (1992) Mislocalization of $\Delta F508$ CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nat. Genet.* 1: 321-327.
 166. **Kerem B.-S., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.-C.** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene : genetic analysis. *Science* 245(4922): 1073-1079.
 167. **Kidd J.F., Ramjeesingh M., Stratford F., Huan L.-J., Bear C.E.** (2004) A heteromeric complex of the two nucleotide binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mediates ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 279(40): 41664-41669.
 168. **Klein I., Sarkadi B., Varadi A.** (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochem Biophys Acta.* 1461(2):237-62.
 169. **Kleizen B., van Vlijmen T., de Jonge H.R., Braakman I.** (2005) Folding of CFTR is predominantly cotranslational. *Mol. Cell* 20: 277-287.
 170. **Knowles M.R., Carson J.L., Collier A.M., Gatzky J.T., Boucher R.C.** (1981) Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.* 124(4):484-90.
 171. **Knowles M.R., Stutts M.J., Spock A., Fischer N., Gatzky J.T., Boucher R.C.** (1983) Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 221(4615):1067-70.
 172. **Knowlton R.G., Cohen-Haguenauer O., Van Cong N., Frezal J., Brown V.A., Barker D., Braman J.C., Schumm J.W., Tsui L.-C., Buchwald M., et al.** (1985) A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318(6044):380-2.

173. **Ko Y.H. & Pedersen P.L.** (1995) The first nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator can function as an active ATPase. *J. Biol. Chem.* 271(45): 28463-28468.
174. **Kogan I., Ramjeesingh M., Li C., Kidd J.F., Wang Y., Leslie E.M., Cole S.P.C., Bear C.E.** (2003) CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J.* 22(9): 1981-1989.
175. **Kong F., Young L., Chen Y., Ran H., Meyers M., Joseph P., Cho Y.H., Hassett D.J., Lau G.W.** (2006) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell. Microbiol.* 8(7): 1121-1133.
176. **Kunzelmann K., Kiser G.L., Schreiber R., Riordan J.R.** (1997a) Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Letters* 400(3): 341-344.
177. **Kunzelmann K., Mall M., Briel M., Hipper A., Nitschke R., Ricken S., Greger R.** (1997b) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca²⁺ activated Cl⁻ conductance of xenopus oocytes. *Pflugers Arch.* 435(1): 178-181.
178. **Kwon S.-H., Pollard H., Guggino W.B.** (2007) Knockdown of NHERF1 enhances degradation of temperature rescued Δ F508 CFTR from the cell surface of human airway cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 20: 763-772.
179. **Lee J.H., Richter W., Namkung W., Kim K.H., Kim E., Conti M., Lee M.G.** (2007) Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors. *J. Biol. Chem.* 282(14): 10414-10422.
180. **Lee M.G., Wigley W.C., Zeng W., Noel L.E., Marino C.R., Thomas P.J., Muallem S.** (1999a) Regulation of Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. *J. Biol. Chem.* 274(6): 3414-3421.
181. **Lee M.G., Choi J.Y., Luo X., Strickland E., Thomas P.J., Muallem S.** (1999b) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J. Biol. Chem.* 274(21): 14670-14677.
182. **Lewis H.A., Buchanan S.G., Burley S.K., Connors K., Dickey M., Dorwart M., Fowler R., Gao X., Guggino W.B., Hendrickson W.A., Hunt J.F., Kearins M.C., Lorimer D., Maloney P.C., Post K.W., Rajashankar K.R., Rutter M.E., Sauder**

- J.M., Shriver S., Thibodeau P.H., Thomas P.J., Zhang M., Zhao X., Emtage S.** (2004) Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.* 23: 282-293.
183. **Lewis H.A., Zhao X., Wang C., Sauder J.M., Rooney I., Noland B.W., Lorimer D., Kearins M.C., Connors K., Condon B., Maloney P.C., Guggino W.B., Hunt J.F., Emtage S.** (2005) Impact of the $\Delta F508$ mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J. Biol. Chem.* 280(2): 1346-1353.
184. **Li C., Ramjeesingh M., Wang W., Garami E., Hewryk M., Lee D., Rommens J.M., Galley K., Bear C.E.** (1996a) ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 271(45): 28463-28468.
185. **Li C., Ramjeesingh M., Bear C.E.** (1996b) Purified cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) does not function as an ATP channel. *J. Biol. Chem.* 271(20): 11623-11626.
186. **Li C. & Naren A.P.** (2005) Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacology & Therapeutics* 108: 208-223.
187. **Li C., Dandridge K.S., Di A., Marrs K.L., Harris E.L., Roy K., Jackson J.S., Makarova N.V., Fujiwara Y., Farrar P.L., Nelson D.J., Tigyi G.J., Naren A.P.** (2005) Lysophosphatidic acid inhibits cholera toxin-induced secretory diarrhea through CFTR-dependant protein interactions. *J. Exp. Med.* 202(7): 975-986.
188. **Li C., Krishnamurthy P.C., Penmasta H., Marrs K.L., Wang X.Q., Zaccolo M., Jalink K., Li M., Nelson D.J., Schuetz J.D., Naren A.P.** (2007) Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell* 131: 940-951.
189. **Linsdell P., Evagelidis A., Hanrahan J.W.** (1997) Molecular determinants of anion selectivity in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *Biophys. J.* 78(6): 2973-2982.
190. **Linton K.J., Higgins C.F.** (1998) The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol.* 28(1):5-13.
191. **Linton K.J.** (2007) Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* 22:122-30.
192. **Locher K.P., Lee A.T., Rees A.C.** (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296(5570): 1091-1098.

193. **London E. & Khorana H.G.** (1982) Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures. *J. Biol. Chem.* 257(12): 7003-7011.
194. **Loo M.A., Jensen T.J., Cui L., Hou Y.-X., Chang X.-B., Riordan J.R.** (1998) Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J.* 17(23): 6879-6887.
195. **Loussouarn G., Demolombe S., Mohammad-Panah R., Escande D., Baro I.** (1996) Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am. J. Physiol.* 271: C1565-C1573.
196. **Lu C., Jiang C., Pribanic S., Rotin D.** (2007) CFTR stabilizes ENaC at the plasma membrane. *J. Cys. Fibros.* 6(6): 419-422.
197. **Lu M., Leng Q., Egan M.E., Caplan M.J., Boulpaep E.L., Giebisch G.H., Hebert S.C.** (2006) CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J. Clin. Invest.* 116(3): 797-807.
198. **Lu Y., Xiong X., Helm A., Kimani K., Bragin A., Skach W.R.** (1998) Co- and posttranslational translocation mechanisms direct cystic fibrosis transmembrane conductance regulator N terminus transmembrane assembly. *J. Biol. Chem.* 273(1): 568-576.
199. **Lukacs G.L., Chang X.-B., Kartner N., Rotstein O.D., Riordan J.R., Grinstein S.** (1992) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is present and functional in endosomes. *J. Biol. Chem.* 267(21): 14568-14572.
200. **Lukacs G.L., Chang X.-B., Bear C.E., Kartner N., Mohamed A., Riordan J.R., Grinstein S.** (1993) The $\Delta F508$ mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 268(29): 21592-21598.
201. **Lukacs G.L., Mohamed A., Kartner N., Chang X.-B., Riordan J.R., Grinstein S.** (1994) Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart ($\Delta F508$) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* 13(24): 6076-6086.
202. **Lukacs G.L., Segal G., Kartner N., Grinstein S., Zhang F.** (1997) Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependant endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem. J.* 328: 353-361.
203. **Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B.** (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 194-222.

204. **Ma J., Zhao J., Drumm M.L., Xie J., Davis P.B.** (1997) Function of the R domain in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J. Biol. Chem.* 272(44): 28133-28141.
205. **Mall M., Hipper A., Greger R., Kunzelmann K.** (1996) Wild type but not deltaF508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in xenopus oocytes. *FEBS Lett.* 381(1-2): 47-52.
206. **Mall M., Bleich M., Greger R., Schreiber R., Kunzelmann K.** (1998) The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J. Clin. Invest.* 102: 15-21.
207. **Mall M., Bleich M., Kuchr J., Brandis M., Greger R., Kunzelmann K.** (1999) CFTR mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol.* 277: G709-G716.
208. **McNicholas C.M., Yang Y., Giebisch G., Hebert S.C.** (1996) Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K⁺ channel (ROMK2). *Am. J. Physiol.* 271(2 Pt 2): F275-285.
209. **Meacham G.C., Lu Z., King S., Sorscher E., Tousson A., Cyr D.M.** (1999) The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J.* 18: 492-505.
210. **Meacham G.C., Patterson C., Zhang W., Younger J.M., Cyr D.M.** (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* 3:100-105.
211. **Mennie M., Gilfillan A., Brock D.J., Liston W.A.** (1995) Heterozygotes for the delta F508 cystic fibrosis allele are not protected against bronchial asthma. *Nat. Med.* 1: 978-979.
212. **Mense M., Vergani P., White D.M., Altberg G., Nairn A.C., Gadsby D.C.** (2006) In vivo phosphorylation of CFTR promotes formation of a nucleotide-binding domain heterodimer. *EMBO J.* 25(20): 4728-4739.
213. **Montserrat C., Merten M., Figarella C.** (1996) Defective ATP-dependent mucin secretion by cystic fibrosis pancreatic epithelial cells. *FEBS Lett.* 393(2-3): 264-268.
214. **Moody J.E., Millen L., Binns D., Hunt J.F., Thomas P.J.** (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J. Biol. Chem.* 277(24): 21111-21114.

215. **Morales M.M., Carroll T.P., Morita T., Schwiebert E.M., Devuyst O., Wilson P.D., Lopes A.G., Stanton B.A., Dietz H.C., Cutting G.R., Guggino W.B.** (1996) Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am. J. Physiol.* 270: F1038-1048.
216. **Moreau C., Jacquet H., Prost A.-L., D'Hahan N., Vivaudou M.** (2000) The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J.* 19(24): 6644-6651.
217. **Mothes W., Heinrich S.U., Graf R., Nilsson I., von Heijne G., Brunner J., Rapoport T.A.** (1997) Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89: 523-533.
218. **Moyer B.D., Duhaime M., Shaw C., Denton J., Reynolds D., Karlson K.H., Pfeiffer J., Wang S., Mickle J.E., Milewski M., Cutting G.R., Guggino W.B., Li M., Stanton B.A.** (2000) The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 275(35): 27069-27074.
219. **Mukherjee S., Ghosh R.N., Maxfield F.R.** (1997) Endocytosis. *Physiol. Rev.* 77(3): 759-803.
220. **Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73.
221. **Nagel G., Szellas T., Riordan J.R., Friedrich T., Hartung K.** (2001) Non-specific activation of the epithelial sodium channel by the CFTR chloride channel. *EMBO Rep.* 2(3): 249-254.
222. **Nakatsukasa K. & Brodsky J.L.** (2008) The Recognition and Retrotranslocation of Misfolded Proteins from the Endoplasmic Reticulum. *Traffic* sous presse.
223. **Naren A.P., Nelson D.J., Xie W., Jovov B., Pevsner J., Bennett M.K., Benos D.J., Quick M.W., Kirk K.L.** (1997) Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. *Nature* 390(6657): 302-305.
224. **Naren A.P., Quick M.W., Collawn J.F., Nelson D.J., Kirk K.L.** (1998) Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95(18): 10972-10977.
225. **Naren A.P., Cormet-Boyaka E., Fu J., Villain M., Blalock J.E., Quick M.W., Kirk K.L.** (1999) CFTR chloride channel regulation by an interdomain interaction. *Science* 286(5439): 544-548.

226. **Naren A.P., Cobb B., Li C., Roy K., Nelson D., Heda G.D., Liao J., Kirk K.L., Sorscher E.J., Hanrahan J.W., Clancy J.P.** (2003) A macromolecular complex of beta 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100(1): 342-346.
227. **Neher E. & Sakmann B.** (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260(5554): 799-802.
228. **Norez C., Noel S., Wilke M., Bijvelds M., Joma H., Melin P., De Jonge H., Becq F.** (2006) Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the α -glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett.* 580(8): 2081-2086.
229. **Ostedgaard L.S., Rich D.P., DeBerg L.G., Welsh M.J.** (1997) Association of domains within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 36: 1287-1294.
230. **Ostedgaard L.S., Baldursson O., Vermeer D.W., Welsh M.J., Robertson A.D.** (2000) A functional R domain from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is predominantly unstructured in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(10): 5657-5662.
231. **Ostedgaard L.S., Randak C., Rokhlina T., Karp P., Vermeer D., Ashbourne Excoffon K.J., Welsh M.J.** (2003) Effects of C-terminal deletions on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in cystic fibrosis airway epithelia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100(4): 1937-1942.
232. **Ou W.J., Cameron P.H., Thomas D.Y., Bergeron J.J.** (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* 364(6640): 771-776.
233. **Paradiso A.M., Ribeiro C.M., Boucher R.C.** (2001) Polarized signaling via purinoreceptors in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J. Gen. Physiol.* 117(1): 53-67.
234. **Parodi A.J.** (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.* 348(1): 1-13.
235. **Parsell D.A. & Lindquist S.** (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437-496.
236. **Pasyk E.A. & Foskett J.K.** (1995) Mutant (Δ F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270(21): 12347-12350.

237. **Pehlam H.R.B.** (1997) Green light for Golgi traffic. *Nature*. 389(6646): 17-20.
238. **Peter K., Varga K., Bebök Z., McNicholas-Bevensee C.M., Schwiebert L., Sorscher E.J., Schwiebert E.M., Collawn J.F.** (2002) Ablation of internalization signals in the carboxyl-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhances cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 277(51): 49952-49957.
239. **Petersen O.H. & Philpott H.G.** (1980) Mouse pancreatic acinar cells: the anion selectivity of the acetylcholine-opened chloride pathway. *J. Physiol.* 306: 481-492.
240. **Picciano J.A., Ameen N., Grant B.D., Bradbury N.A.** (2003) Rme-1 regulates the recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285(5): C1009-C1018.
241. **Pier G.B., Grout M., Zaidi T.S.** (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94(22): 12088-12093.
242. **Pier G.B., Grout M., Zaidi T.S., Meluleni G., Mueshenborn S.S., Banting G., Ratcliff R., Evans M.J., Colledge W.H.** (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393(6680): 79-82.
243. **Pietrement C., Da Silva N., Silberstein C., James M., Marsolais M., Van Hoek A., Brown D., Pastor-Soler N., Ameen N., Laprade R., Ramesh V., Breton S.** (2008) Role of NHERF1, CFTR and cAMP in the regulation of aquaporin 9. *J. Biol. Chem.* 283(5): 2986-2996.
244. **Pind S., Riordan J.R., Williams D.B.** (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 269(17): 12784-12788.
245. **Pinkett H.W., Lee A.T., Lum P., Locher K.P., Rees D.C.** (2007) An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* 315(5810): 373-7.
246. **Pollet J.-F., van Geffel J., van Stevens E., van Geffel R., Beauwens R., Bollen A., Jacobs P.** (2000) Expression and intracellular processing of chimeric and mutant CFTR molecules. *Biochem Biophys Acta*. 1500: 59-69.
247. **Popot J.-L. & Engelman D.M.** (1990) Membrane protein folding and oligomerization. *Biochemistry* 29: 4031-4037.
248. **Prince L.S., Workman R.B., Marchase R.B.** (1994) Rapid endocytosis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91(11): 5192-5196.

249. **Prince L.S., Peter K., Hatton S.R., Zaliauskiene L., Cotlin L.F., Clancy J.P., Marchase R.B., Collawn J.F.** (1999) Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal. *J. Biol. Chem.* 274(6): 3602-3609.
250. **Qu B.-H. & Thomas P.J.** (1996) Alteration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding pathway. *J. Biol. Chem.* 271(13): 7261-7264.
251. **Qu B.-H., Strickland E.H., Thomas P.J.** (1997) Localization and suppression of a kinetic defect in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding. *J. Biol. Chem.* 272(25): 15739-15744.
252. **Quinton P.M.** (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301(5899):421-2.
253. **Raghuram V., Mak D.-O D., Foskett J.K.** (200&) Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc. Natl Acad. Soc. USA* 98(3): 1300-1305.
254. **Ramjeesingh M., Huan L.J., Garami E., Bear C.E.** (1999) Novel method for evaluation of the oligomeric structure of membrane proteins. *Biochem. J.* 342(Pt 1): 119-123.
255. **Ramjeesingh M., Ugwu F., Li C., Dhani S., Huan L.J., Wang Y., Bear C.E.** (2003) Stable dimeric assembly of the second membrane-spanning domain of CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) reconstitutes a chloride-selective pore. *Biochem. J.* 375(Pt 3): 633-641.
256. **Ramjeesingh M., Ugwu F., Stratford F.L., Huan L.J., Li C., Bear C.E.** (2008) The intact CFTR protein mediates ATPase rather than adenylate kinase activity. *Biochem. J.* sous presse.
257. **Randak C., Neth P., Auerswald E.A., Eckerskorn C., Assfalg-Machleidt I., Machleidt W.** (1997) A recombinant polypeptide model of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functions as an active ATPase, GTPase and adenylate kinase. *FEBS Letters* 410: 180-186.
258. **Randak C. & Welsh M.J.** (2003) An intrinsic adenylate kinase activity regulates gating of the ABC transporter CFTR. *Cell* 115: 837-850.
259. **Randak C. & Welsh M.J.** (2007) Role of CFTR's intrinsic adenylate kinase activity in gating of the Cl⁻ channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39(5-6): 473-479.
260. **Rapoport T.A., Goder V., Heinrich S.U., Matlack K.E.S.** (2004) Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol.* 14(10): 568-575.

261. **Reddy M.M., Quinton P.M., Haws C., Wine J.J., Grygorczyk R., Tabcharani J.A., Hanrahan J.W., Gunderson K.L., Kopito R.R.** (1996) Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science* 271(5257): 1876-1879.
262. **Reddy M.M., Sun D., Quinton P.M.** (2001) Apical heterotrimeric G-proteins activate CFTR in the native sweat duct. *J. Membr. Biol.* 179: 51-61.
263. **Reddy M.M. & Quinton P.M.** (2003) Functionnal interaction of CFTR and ENaC in sweat glands. *Pflügers Arch.* 445(4): 499-503.
264. **Reddy M.M. & Quinton P.M.** (2006) ENaC activity requires CFTR channel function independently of phosphorylation in sweat duct. *J. Membr. Biol.* 207: 23-33.
265. **Reigada D. & Mitchell C.H.** (2005) Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288(1): C132-C140.
266. **Reisin I.L., Prat A.G., Abraham E.H., Amara J.F., Gregory R.J., Ausiello D.A., Cantiello H.F.** (1994) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J. Biol. Chem.* 269(32): 20584-20591.
267. **Rennolds J., Boyaka P.N., Bellis S.L., Cormet-Boyaka E.** (2008) Low temperature induce the delivery of mature and immature CFTR to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366(4): 1025-1029.
268. **Rich D.P., Gregory R.J., Anderson M.P., Manavalan P., Smith A.E., Welsh M.J.** (1991) Effect of deleting the R domain on CFTR-generated chloride channels. *Science* 253(5016):205-7.
269. **Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B.-S., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.-L., Drumm M.L., Iannuzzi M.C., Collins F.S., Tsui L.-C.** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922): 1066-1073.
270. **Riordan J.R.** (2005) Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 701-718.
271. **Rodman D.M. & Zamudio S.** (1991) The cystic fibrosis heterozygote: advantage in surviving cholera? *Med. Hypotheses* 36: 253-258.
272. **Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B.-S., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L.-C., Collins F.S.** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245(4922): 1059-1065.

273. **Rosenberg M.F., Kamis A.B., Aleksandrov L.A., Ford R.C., Riordan J.R.** (2004) Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J. Biol. Chem.* 279(37): 39051-39057.
274. **Roum J.H., Buhl R., McElvaney N.G., Borok Z., Crystal R.G.** (1993) Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J. Appl. Physiol.* 75(6): 2419-2424.
275. **Rubenstein R.C., Egan M.E., Zeitlin P.L.** (1997) In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J. Clin. Invest.* 100(10): 2457-2465.
276. **Rubenstein R.C. & Zeitlin P.L.** (1998) A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in Δ F508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157(2): 484-490.
277. **Rüdel R. & Lehmann-Horn F.** (1985) Membrane changes in cells from myotonia patients. *Physiol. Rev.* 65(2): 310-356.
278. **Rudnudin A., Schulze D.H., Sullivan S.K., Lederer W.J., Welling P.A.** (1998) Novel subunit composition of a renal epithelial KATP channel. *J. Biol. Chem.* 273(23): 14165-14171.
279. **Sadlish H. & Skach W.R.** (2004) Biogenesis of CFTR and other polytopic membrane proteins: new roles for the ribosome-translocon complex. *J. Membr. Biol.* 202(3): 115-126.
280. **Sato S., Ward C.L., Krouse M.E., Wine J.J., and Kopito R.R.** (1996) Glycerol reverse the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.* 271(2): 635-638.
281. **Sawano H., Koumoto Y., Ohta K., Sasaki Y., Segawa S., Tachibana H.** (1992) Efficient in vitro folding of the three-disulfides derivatives of hen lysozymes in the presence of glycerol. *FEBS Letters* 303:11-14.
282. **Saxena S.K. & Kaur S.** (2006) Regulation of epithelial ion channels by Rab GTPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351: 582-587.
283. **Schekman R. & Orci L.** (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271(5255): 1526-1533.
284. **Schneider C., Sepp-Lorenzino L., Nimmesgern E., Ouerfelli O., Danishefsky S., Rosen N., Hartl F.U.** (1996) Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93(25): 14536-14541.

285. **Schofield P.R., Darlison M.G., Fujita N., Burt D.R., Stephenson F.A., Rodriguez H., Rhee L.M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T.A. *et al.*** (1987) Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows as ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328(6127): 221-227.
286. **Schoumacher R.A., Shoemaker R.L., Halm D.R., Tallant E.A., Wallace R.W., Frizzell R.A.** (1987) Phosphorylation fails to activate chloride channels from cystic fibrosis airway cells. *Nature* 330(6150):752-4.
287. **Schreiber R., Greger R., Nitschke R., Kunzelmann K.** (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in xenopus oocytes. *Pflugers Arch.* 434(6): 841-847.
288. **Schreiber R., Hopf A., Mall M., Greger R., Kunzelmann K.** (1999a) The first-nucleotide binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96(9): 5310-5315.
289. **Schreiber R., Nitschke R., Greger R., Kunzelmann K.** (1999b) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 274(17): 11811-11816.
290. **Schroeder S.A., Gaughan D.M., Swift M.** (1995) Protection against bronchial asthma by CFTR delta F508 mutation: a heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Nat. Med.* 1:703-705.
291. **Schroeder T.H., Lee M.M., Yacono P.W., Cannon C.L., Gerceker A.A., Golan D.E., Pier G.B.** (2002) CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(10): 6907-6912.
292. **Schweizer A., Ericsson M., Bacchi T., Griffiths G., Hauri H.P.** (1993) Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implication for the organization of the ER-to-Golgi pathway. *J. Cell Sci.* 104(Pt 3): 671-683.
293. **Schwiebert E.M., Flotte T., Cutting G.R., Guggino W.B.** (1994) Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell currents. *Am. J. Physiol.* 266: C1464-1477.
294. **Schwiebert E.M., Egan M.E., Hwang T.H., Fulmer S.B., Allen S.S., Cutting G.R., Guggino W.B.** (1995) CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81: 1063-1073.

295. **Schwiebert E.M., Morales M.M., Devidas S., Egan M.E., Guggino W.B.** (1998) Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(5): 2674-2679.
296. **Schwiebert E.M., Benos D.J., Egan M.E., Stutts M.J., Guggino W.B.** (1999) CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* 79: S145-S166.
297. **Scott-Ward T.S., Cai Z., Dawson E.S., Doherty A., Da Paula A.C., Davidson H., Porteous D.J., Wainwright B.J., Amaral M.D., Sheppard D.M., Boyd A.C.** (2007) Chimeric constructs endow the human CFTR Cl⁻ channel with the gating behaviour of murine CFTR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(41): 16365-16370.
298. **Seibert F.S., Chang X.B., Aleksandrov A.A., Clarke D.M., Hanrahan J.W., Riordan J.R.** (1999) Influence of phosphorylation by protein kinase A on CFTR at the cell surface and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1461(2):275-83.
299. **Seidler U., Blumenstein I., Kretz A., Vieillard-Baron D., Rossmann H., Colledge W.H., Evans M., Ratcliff R., Gregor M.** (1997) A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca⁽²⁺⁾-dependent HCO₃⁻ secretion. *J. Physiol.* 505(Pt2): 411-423.
300. **Serohijos A.W.R., Hegedus T., Aleksandrov A.A., He L., Cui L., Dokholyan N.V., Riordan J.R.** (2008) Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc. Natl Acad. Soc. USA* 105(9): 3256-3261.
301. **Seyama I.** (1979) Characteristics of the anion channel in the sino-atrial node cell of the rabbit. *J. Physiol.* 294: 447-460.
302. **Sharma M., Benharouga M., Hu W., Lukacs G.L.** (2001) Conformational and temperature-sensitive stability defects of the ΔF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. *J. Biol. Chem.* 276(12): 8942-8950.
303. **Sharma M., Pampinella F., Nemes C., Benharouga M., So J., Du K., Bace K.G., Papsin B., Zerangue N., Stenmark H., Lukacs G.L.** (2004) Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control of early endosomes. *J. Cell. Biol.* 164: 923-933.
304. **Sheppard D.N., Ostedgaard L.S., Rich D.P., Welsh M.J.** (1994) The amino-terminal portion of CFTR forms a regulated Cl⁻ channel. *Cell* vol. 76: 1091-1098.

305. **Shier W.T.** (1979) Increased resistance to influenza as a possible source of heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Med. Hypothesis* 5: 661-667.
306. **Short D.B., Trotter K.W., Reczek D., Kreda S.M., Bretscher A., Boucher R.C., Stutts M.J., Milgram S.L.** (1998) An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273(31): 19797-19810.
307. **Shyng S. & Nichols C.G.** (1997) Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *J. Gen. Physiol.* 110(6): 655-664.
308. **Smith P.C., Karpowich N., Millen L., Moody J.E., Rosen J., Thomas P.J., Hunt J.F.** (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Molecular Cell* 10: 139-149.
309. **Sollner T., Whiteheart S.W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P., Rothman J.E.** (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362(6418): 318-324.
310. **Stoker M., MacPherson I.** (1964) Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and ITS derivatives. *Nature* 203:1355-7.
311. **Stratford F.L., Pereira M.M., Becq F., McPherson M.A., Dormer R.L.** (2003) Benzo(c)quinolizinium drugs inhibit degradation of Delta F508-CFTR cytoplasmic domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300(2): 524-530.
312. **Stratford F.L.L., Ramjeesingh M., Cheung J.C., Huan L.-J., Bear C.E.** (2007) The Walker B motif of the second nucleotide-binding domain (NBD2) of CFTR plays a key role in ATPase activity by the NBD1-NBD2 heterodimer. *Biochem. J.* 401: 581-586.
313. **Strickland E., Qu B.-H., Millen L., Thomas P.J.** (1997) The molecular chaperone Hsc70 assists the *in vitro* folding of the N-terminal nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 272(41): 25421-25424.
314. **Stutts M.J., Canessa C.M., Olsen J.C., Hamrick M., Cohn J.A., Rossier B.C., Boucher R.C.** (1995) CFTR as a cAMP-dependant regulator of sodium channels. *Science* 269(5225):847-850.
315. **Sugita M., Yue Y., Foskett J.K.** (1998) CFTR Cl⁻ channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J.* 17(4): 898-908.
316. **Suzuki M., Morita T., Iwamoto T.** (2006) Diversity of Cl⁻ channels. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(1): 12-24.

317. **Swiatecka-Urban A., Duhaime M., Coutermarsh B., Karlson K.H., Collawn J., Milewski M., Cutting G.R., Guggino W.B., Langford G., Stanton B.A.** (2002) PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 277(42): 40099-40105.
318. **Swiatecka-Urban A., Boyd C., Coutermarsh B., Karlson K.H., Barnaby R., Aschenbrenner L., Langford G.M., Hasson T., Stanton B.A.** (2004) Myosin VI regulates of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 279(36): 38025-38031.
319. **Swiatecka-Urban A., Brown A., Moreau-Marquis S., Renuka J., Coutermarsh B., Barnaby R., Karlson K.H., Flotte T.R., Fukuda M., Langford G.M., Stanton B.A.** (2005) The short apical membrane half-life of rescued Δ F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of Δ F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280(44): 36762-36772.
320. **Tabcharani J.A., Chang X.B., Riordan J.R., Hanrahan J.W.** (1991) Phosphorylation-regulated Cl^- channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352(6336):628-31.
321. **Tabcharani J.A., Rommens J.M., Hou Y.X., Chang X.B., Tsui L.-C., Riordan J.R., Hanrahan J.W.** (1993) Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature* 366(6450): 79-82.
322. **Tanabe K., Tucker S.J., Matsuo M., Proks P., Ashcroft F.M., Seino S., Amachi T., Ueda K.** (1999) Direct photoaffinity labelling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K^+ channel by 8-azido-ATP. *J. Biol. Chem.* 274(7): 3931-3933.
323. **Tarran R., Loewen M.E., Paradiso A.M., Olsen J.C., Gray M.A., Argent B.E., Boucher R.C., Gabriel S.E.** (2002) Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca^{2+} -activated Cl^- conductances. *J. Gen. Physiol.* 120(3): 407-418.
324. **Tector M. & Hartl F.U.** (1999) An unstable transmembrane segment in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.* vol. 18 n°32: 6290-6298.
325. **Thelin W.R., Kesimer M., Tarran R., Kreda S.M., Grubb B.R., Sheehan J.K., Stutts M.J., Milgram S.L.** (2005) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is regulated by a direct interaction with the protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 280(50): 41512-41520.

326. **Thelin W.R., Chen Y., Gentzsch M., Kreda S.M., Sallee J.L., Scarlett C.O., Borchers C.H., Jacobson K., Stutts M.J., Milgram S.L.** (2007) Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J. Clin. Invest.* 117(2): 364-374.
327. **Thibodeau P.H., Brautigam C.A., Machius M., Thomas P.J.** (2005) Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* 12(1): 10-16.
328. **Thomas P.J., Shenbagamurthi P., Ysern X., Pederen P.L.** (1991) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: nucleotide binding to a synthetic peptide. *Science* 251(4993): 555-557.
329. **Thomas P.J., Shenbagamurthi P., Sondek J., Hulihan J.M., Pedersen P.L.** (1992a) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 267(9): 5727-5730.
330. **Thomas P.J., Ko Y.H., Pedersen P.L.** (1992b) Altered protein folding may be the molecular basis of most cases of cystic fibrosis. *FEBS Letters* 312, n°: 7-9.
331. **Thomas P.J. & Pedersen P.L.** (1993) Effects of the delta F508 mutation on the structure, function, and folding of the first nucleotide-binding domain of CFTR. *J Bioenerg Biomembr.* 25(1):11-9.
332. **Tsui L.-C., Buchwald M., Barker D., Braman J.C., Knowlton R., Schumm J.W., Eiberg H., Mohr J., Kennedy D., Plavsic N., et al.** (1985) Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230(4729):1054-7.
333. **Ueda K., Cardarelli C., Gottesman M.M., Pastan I.** (1987) Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 84(9):3004-8.
334. **Van de Vosse E., Ali S., de Visser A.W., Surjadi C., Widjaja S., Vollaard A.M., van Dissel J.T.** (2005) Susceptibility to typhoid fever is associated with a polymorphism in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Hum. Genet.* 118: 138-140.
335. **Varga K., Jurkuvenaite A., Wakefield J., Hong J.S., Guimbellot J.S., Venglarik C.J., Niraj A., Mazur M., Sorscher E.J., Collawn J.F., Bebök Z.** (2004) Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J. Biol. Chem.* 279(21): 22578-22584.

336. **Venglarik C.J., Bridges R.J., Frizzell R.A.** (1990) A simple assay for agonist-regulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 259(2): C358-C364.
337. **Vergani P., Lockless S.W., Nairn A.C., Gadsby D.C.** (2005a) CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* 433(7028): 876-880.
338. **Vergani P., Basso C., Mense M., Nairn A.C., Gadsby D.C.** (2005b) Control of the CFTR channel's gate. *Biochemical Society Transactions* 33(5): 1003-1007.
339. **Verkman A.S.** (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 118(Pt 15): 3225-3332.
340. **Wada I., Rindress D., Cameron P.H., Ou W.J., Doherty J.J., Louvard D., Bell A.W., Dignard D., Thomas D.Y., Bergeron J.J.** (1991) SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 266(29): 19599-19610.
341. **Wada I., Kai M., Imai S., Sakane F., Kanoh H.** (1997) Promotion of transferrin folding by cycling interactions with calnexin and calreticulin. *EMBO J.* 16(17): 5420-5432.
342. **Walker J.E., Saraste M., Gay N.J.** (1982) E. coli F1-ATPase interacts with a membrane protein component of a proton channel. *Nature* 298(5877):867-9.
343. **Wang S., Raab R.W., Schatz P.J., Guggino W.B., Li M.** (1998) Peptide binding consensus of NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett.* 427: 103-108.
344. **Wang S., Yue H., Derin R.B., Guggino W.B., Li M.** (2000) Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 103(1): 169-179.
345. **Wang W., He Z., O'Shaughnessy T.J., Rux J., Reenstra W.W.** (2002) Domain-domain associations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282: C1170-C1180.
346. **Wang X., Matteson J., An Y., Moyer B., Yoo J., Bannykh S., Wilson I.A., Riordan J.R., Balch W.E.** (2004) COPII-dependant export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic code. *J. Cell Biol.* 167(1): 65-74.
347. **Wang X., Venable J., Lapointe P., Hutt D.M., Koulov A.V., Coppinger J., Gurkan C., Kellner W., Matteson J., Plutner H., Riordan J.R., Kelly J.W., Yates**

- III J.R., Balch W.E. (2006) Hsp90 Cochaperone Aha1 Downregulation Rescues Misfolding of CFTR in Cystic Fibrosis. *Cell* 127(4):803-815.
348. Wang Y., Loo T.W., Bartlett M.C., Clarke D.M. (2007) Correctors promote maturation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by binding to the protein. *J. Biol. Chem.* 282(46): 33247-33251.
349. Ward C.L. & Kopito R.R. (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 269(41): 25710-25718.
350. Ward C.L., Omura S., Kopito R.R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83: 121-127.
351. Ware F.E., Vassilakos A., Peterson P.A., Jackson M.R., Lehrman M.A., Williams D.B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNac2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 270(9): 4697-4704.
352. Welsh M.J. & Smith A.E. (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73(7):1251-4.
353. Welsh M.J. & Smith A.E. (1995) Cystic fibrosis. *Sci Am.* 273(6):52-9.
354. Yamashiro Y., Shimizu T., Ogushi S., Shioya T., Nagata S., Ohtsuka Y. (1997) The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 24(5): 544-547.
355. Warrens A.N., Jones M.D., Lechler R.I. (1997) Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* 186(1): 29-35.
356. Wegele H., Wandinger S.K., Schmid A.B., Reinstein J., Buchner J. (2006) Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J. Mol. Biol.* 356(3): 802-811.
357. Wei L., Venkeerberghen A., Cuppens H., Eggermont J., Cassiman J.J., Droogmans G., Nilius B. (1999) Interaction between calcium-activated chloride channels and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch.* 438(5): 635-641.
358. Wei L., Venkeerberghen A., Cuppens H., Cassiman J.J., Droogmans G., Nilius B. (2001) The C-terminal part of the R domain, but not the PDZ binding motif, of CFTR is involved in interaction with Ca(2+)-activated Cl⁻ channels. *Pflugers Arch.* 442(2): 280-285.

359. **Weixel K.M. & Bradbury N.A.** (2000) The carboxyl terminal of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.* 275(5): 3655-3660.
360. **Weixel K.M. & Bradbury N.A.** (2001) Endocytic adaptor complexes bind the C-terminal domain of CFTR. *Pflügers Arch.* 443 Suppl. 1: S70-S74.
361. **Wendeler M.W., Nufer O., Hauri H.-P.** (2007) Improved maturation of CFTR by an ER export signal. *FASEB J.* 21(10): 2352-2358.
362. **Wigley W.C., Vijayakumar S., Jones J.D., Slaughter C., Thomas P.J.** (1998) Transmembrane domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: design, characterization, and secondary structure of synthetic peptides m1-m6. *Biochemistry* 37: 844-853.
363. **Yang Y., Janich S., Cohn J.A., Wilson J.M.** (1993) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90(20): 9480-9484.
364. **Yoo D., Flagg T.P., Olsen O., Raghuram V., Foskett J.K.** (2004) Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir1.1) channel complex by PDZ interactions. *J. Biol. Chem.* 279(8): 6863-6873.
365. **Yoo J.-S., Moyer B.D., Bannykh S., Yoo H.-M., Riordan J.R., Balch W.E.** (2002) Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 277(13): 11401-11409.
366. **Youker R.T., Walsh P., Beilharz T., Lithgow T., Brodsky J.L.** (2004) Distinct roles for the Hsp40 and Hsp90 molecular chaperones during cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation in yeast. *Mol. Biol. Cell* 15: 4787-4797.
367. **Younger J.M., Ren H.Y., Chen L., Fan C.Y., Fields A., Patterson C., Cyr D.M.** (2004) A foldable CFTR{Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. *J. Cell Biol.* 167(6): 1075-1085.
368. **Yue H., Devidas S., Guggino W.B.** (2000) The two halves of CFTR form a dual-pore ion channel. *J. Biol. Chem.* 275(14): 10030-10034.
369. **Yurko-Mauro K.A. & Reenstra W.W.** (1998) Prostaglandin F2alpha stimulates CFTR activity by PKA and PKC-dependant phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 275(3 Pt 1): C653-C660.

370. **Zerangue N., Schwappach B., Jan Y.N., Jan L.Y.** (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron* 22: 537-548.
371. **Zettlmeissl G., Rudolph R., Jaenicke R.** (1983) Limited proteolysis as a tool to study the kinetics of protein folding: conformational rearrangements in acid-dissociated lactic dehydrogenase as determined by pepsin digestion. *Arch. Biochem. Biophys.* 224(1): 161-168.
372. **Zhang F., Kartner N., Lukacs G.L.** (1998) Limited proteolysis as a probe for arrested conformational maturation of Δ F508 CFTR. *Nat. Struct. Biol.* 5(3): 180-183.
373. **Zhang H., Peters K.W., Sun F., Marino C.R., Lang J., Burgoyne R.D., Frizzell R.A.** (2002) Cystein string protein interacts with and modulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 277(32): 28948-28958.
374. **Zhou Z., Wang X., Liu H.-Y., Zou X., Li M., Hwang T.-C.** (2006) The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J. Gen. Physiol.* 128(4): 413-422.

Abréviations

Abréviations

4PBA : sodium-4-phénylbutyrate.
ABC : ATP Binding Cassette.
ADN : Acide DésoxyriboNucléique.
ADNc: Acide DésoxyriboNucléique complémentaire.
ADP : Adénosine DiPhosphate.
AE2 : Anion Exchanger 2.
Aha1 : Activator of Hsp90 ATPase.
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique.
AP : Adaptor Protein.
AQP : Aquaporine.
ARN : Acide RiboNucléotide.
ATP : Adénosine TriPhosphate.
ATPase : Adénosine TriPhosphatase.
BCA: BiCinchoninic Acid.
BES : acide N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoEthaneSulfonique.
BHK-21 : Baby Hamster Kidney-21.
BiP : Binding Ig Protein.
BSA: SerumAlbumine Bovine.
CaCC : Ca²⁺-activated Chloride Channels.
CAL : CFTR Associated Ligand.
CAP70 : CFTR Associated Protein 70.
CLC : Cl Channel.
CF : Cystic Fibrosis.
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator.
CHIP : C-terminus of Hsc70 Interacting Protein.
CPT-AMPc : 8-(4-chlorophénylthio)-AMPc.
Csp : Cystein string protein.
COPII : COat Protein II.
COS-7 : cellules de *Cercopithecus aethiops*.
 ΔF : délétion de la F508.
DHFR : DiHydroFolate Réductase.
DMEM F12 : Dubelco's Modified Eagle Medium/Ham F12.
DMSO : DiMéthylSulfOxyde.

Abréviations

dNTP : désoxyriboNucléotides TriPhosphates.
DO : Densité Optique.
DPC : DiPhenylamine Carboxylic acid.
EBP50 : Ezrin Binding Protein 50.
ECL : ElectroChemical Luminescence.
EL : Extracellular Loop.
EDEP : ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like protein.
EDTA : Ethylene Diamide Tetraacetic Acid.
ENaC : Epithelial Na⁺ Channel.
EndoH : Endoglycosidase H.
ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated Degradation.
ERC : Endosomal Recycling Compartment.
ERGIC : Endoplasmic Reticulum/Golgi Intermediate Compartment.
ERM : Ezrin, Radixin, Moesin.
ERQC : Endoplasmic Reticulum Quality Control.
FRAP : Fluorescence Recovering After Photobleaching.
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer.
GABA : Gamma Amino Butyric Acid.
GRP : Glucose Regulated Protein.
GTP : Guanosine TriPhosphate.
GTPase : Guanosine TriPhosphatase.
HA : Hémagglutinine.
Hdj : Human DnaJ homologue.
HDL : High Density Lipoprotein.
HEK 293 : Human Embryonic Kidney 293.
HEPES : 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid.
HLA : Human Leukocyte Antigen.
Hsc : Heat shock cognate
Hsp : Heat shock protein.
IBMX : 3-IsoButyl 1-MéthylXanthine
IKEPP : Intestinal and Kidney Enriched PDZ Protein.
Kir : K⁺ Inward Rectifier channel.
LB : milieu Luria-Bertani.
LRP : Lung Resistance-related ProteinL

LSB : Laëmmli Sample Buffer.
MDCKI : Madin Darby Canine Kidney I.
MDR : MultiDrug Resistance.
MRP : MultiResistance Protein.
MVP : Major Vault Protein.
NBD : Nucleotide Binding Domain.
NFκB : Nuclear Factor κ B.
NHE-RF : Na⁺-H⁺ Exchange Regulatory Factor
ORCC : Outwardly Rectifying Chloride Channel.
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.
PBS : Phosphate Buffer Saline.
PCR : Polymerase Chain Reaction.
PDZ : PSD-95/Dlg/ZO-1.
PFO : PerFluoro-Octanoic Acid.
PKA : Protéine Kinase A.
PKC : Protéine Kinase C.
PMSF : PhénylMéthylSulfonyl Fluoride.
PNGase F : Peptide N-Glycosidase F.
PP2A : Protéine Phosphatase 2A
R : domaine de Régulation.
RE : Reticulum Endoplasmique.
RFLP : Restriction Fragment Linked Polymorphism.
RIPA : RadioImmunoPrécipitation buffer.
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.
ROMK : Renal Outer Medullary K⁺ channel.
S1,... : Segment transmembranaire 1,...
SDS : Sodium DodécylSulfate.
SNARE : SNAp Receptor.
SOE : Splicing by Overlap Extension.
SR : SRP Receptor.
SRP : Signal Recognition Particle.
SV40 : Simian Vacuolating Agent 40.
SVF : Sérum de Veau Fœtal.
T_{1/2} : Demie-vie.

Abréviations

TAP : Transporter Antigenic Peptide.

TGN : TransGolgi Network.

TMAO : TriMéthylAmine N-Oxyde.

TMD : Transmembrane Domain.

VTC : Vesicular Tubular Cluster.

wt : Wild Type.

Annexes

JULIEN MICOUD

Nationality: French
Marital status: single

Personal adress

✉ 3, rue de Strasbourg
38000 Grenoble
Phone : +33 (0)476 562 766
@ julmic@wanadoo.fr

Professional adress

✉ CEA/iRTSV/LCBM
17 rue des martyrs
38054 Grenoble cedex 9
Phone : +33 (0)438 783 042
@ julien.micoud@cea.fr

PhD Student in Cell and Molecular Biology

EDUCATION

- 2008** PhD thesis in cell and molecular biology, **University Joseph Fourier**, Grenoble, France.
- 2004** Master 2 in cell and integrative biology: equivalent to master level in Biology, *with honours*. **University Joseph Fourier**, Grenoble, France.
- 2003** «Maîtrise» in cell biology and physiology: equivalent to a M.Sc. in biology, *with honours*. CREPUQ program, **University of Montréal**, Montréal, Canada.
- 2002** «Licence» in cell biology and physiology, equivalent to a B.Sc. in biology, *with honours*. **University Joseph Fourier**, Grenoble, France.
- 1998** «Baccalauréat scientifique»: French high school diploma specialized in biology, *with honours*.

RESEARCH ACTIVITIES

- Laboratory of Metals Chemistry and Biology, directed by Marc Fontecave (UMR 5249 CEA/CNRS/UJF), CEA-Grenoble, France.
Supervisor: Mohamed Benharouga, PhD
How important are NBD1 and NBD2 for CFTR.
- 2003-2004** Laboratory of Biochemistry and Biophysics of the Integrated Systems, directed by Michel Satre (UMR 5092 CEA/CNRS/UJF), CEA-Grenoble, France.
Supervisor: Yves Jouanneau, PhD
Characterization of a new type of salicylate 1-hydroxylase involved in the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) degradation of *Sphingomonas* sp. Strain CHY-1.
- Department of biological sciences, directed by Thérèse Cabana, University of Montréal, Montréal, Canada.
Supervisor: Hakima Moukhès, PhD
Role of the Laminin in the Dystrophin Glycoprotein Complex of retinal Muller cells.

TECHNICAL SKILLS

- Molecular biology** PCR, site-directed mutagenesis, splicing by overlap extension by PCR, basic cloning, isolation of total RNA and reverse transcription, genomic DNA isolation.

Cell biology	Mammalian adherent cell culture, immunocytochemistry, confocal microscopy, cell disruption by nitrogen cavitation and isolation of subcellular microsomes by differential centrifugation.
Biochemistry	Western-blotting, immunoprecipitation, pulse-chase, limited proteolysis, protein expression in <i>E. coli</i> and <i>P. putida</i> , protein purification by ion exchange and affinity chromatography, HPLC, spectrophotometric enzyme assays, basic enzymology.
Physiology	iodide efflux assays.

LANGUAGES & SPECIAL SKILLS

Languages	French: native, English: written and understood.
Current use of computing	Data processing (Word, Excel, Powerpoint) and image processing (Photoshop).

COMMUNICATIONS

Oral communications

March 2008	Micoud J , De Keukeleire B, Scheckenbach L, Chanson M, Benharouga M. Qu'est ce qui détermine la stabilité membranaire de la protéine CFTR? 9 ^{ème} colloque des jeunes chercheurs de la mucoviscidose, Paris, France.
October 2007	Micoud J , De Keukeleire B, Scheckenbach L, Chanson M, Benharouga M. L'interaction NBD1-NBD2 contrôle la stabilité de CFTR dans la membrane plasmique. 5 ^{ème} colloque ABC franco-belge, Paris, France.
August 2007	De Keukeleire B, Micoud J , Benharouga M. GTP-dependent degradation of $\Delta F508$. 1st European CF young investigator meeting, Lille, France.
April 2006	Micoud J , De Keukeleire B, Picarreta F, Benharouga M. Caractérisation du rôle des domaines NBD1 et NBD2 de la protéine CFTR. 7 ^{ème} colloque des jeunes chercheurs de la mucoviscidose, Nogent-sur-Marne, France.

Posters

October 2007	Micoud J , De Keukeleire B, Scheckenbach L, Chanson M, Benharouga M. NBD1-NBD2 interaction modulate CFTR plasma membrane stability. 21 th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, USA.
March 2007	Micoud J , De Keukeleire B, Berthet J, Donadio S, Piccarreta F, Benharouga M. Le couple NBD1/NBD2 et la protéine CFTR. 8 ^{ème} colloque des jeunes chercheurs de la mucoviscidose, Paris, France.
October 2005	De Keukeleire B, Micoud J , Picarreta F, Benharouga M. Degradation of $\Delta F508$ -CFTR protein in the endoplasmic reticulum requires a GTP-dependent protease(s) activity. 19 th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, USA.

PUBLICATIONS

De Keukeleire B, **Micoud J**, Biard J, Benharouga M. Endoplasmic reticulum-associated degradation of mutant CFTR requires a guanine nucleotide-sensitive step. *Int J Biochem Cell Biol*. Accepted.

Jouanneau Y, **Micoud J**, Meyer C. Purification and characterization of a three-component salicylate 1-hydroxylase from *Sphingomonas* CHY-1. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Dec;73(23): 7515-21.

De Keukeleire B, Donadio S, **Micoud J**, Lechardeur D, Benharouga M. Human cellular prion protein hPrPC is sorted to the apical membrane of epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 23;354(4):949-54.

Donadio S, Alfaidy N, De Keukeleire B, **Micoud J**, Feige JJ, Challis JR, Benharouga M. Expression and localization of cellular prion and COMMD1 proteins in human placenta throughout pregnancy. *Placenta*. 2007 Aug-Sep;28(8-9):907-11.

Noel G, Belda M, Guadagno E, **Micoud J**, Klocker N, Moukhles H. Dystroglycan and Kir4.1 coclustering in retinal Muller glia is regulated by laminin-1 and requires the PDZ-ligand domain of Kir4.1. *J Neurochem*. 2005 Aug;94(3):691-702.

Demaneche S, Meyer C, **Micoud J**, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a sphingomonas strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Nov;70(11):6714-25.

TEACHING EXPERIENCE

UNIVERSITY

- | | |
|-------------------------------------|--|
| 2nd semester 2007 | University Joseph Fourier, Grenoble, France. Cell biology laboratory to 2 nd year undergraduate students. 32 hours. |
| 2nd semester 2006 | University Joseph Fourier, Grenoble, France. Cell biology laboratory to 2 nd year undergraduate students. 32 hours. |

STUDENT SUPERVISION

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 1st semester 2007 | Supervision of a master's degree student in cell biology. |
|-------------------------------------|---|

SKILLS & INTERESTS

- | | |
|----------------|---|
| Sport | All, particularly rugby (10 years practical). |
| History | Particularly Antiquity. |
| Travels | Canada, United States of America, Spain, Italy, United Arab Emirates. |

REFERENCES

- | | |
|--------------------------|--|
| Thesis supervisor | Mohamed Benharouga, PhD
UMR CNRS-5249/ CEA/iRTSV/LCBM
17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France
Email: mohamed.benharouga@cea.fr |
| Master supervisor | Yves Jouanneau, PhD
UMR CNRS-5249/ CEA/iRTSV/LCBM
17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France
Email: yves.jouanneau@cea.fr |

Résumé :

CFTR est un canal chlorure appartenant à la superfamille des transporteurs ABC. Cette protéine est composée de 5 domaines : 2 domaines de liaison aux nucléotides (NBDs), 2 domaines transmembranaires (TMD) et un domaine de régulation. Les interactions entre ces différents domaines sont essentielles pour de nombreux processus, tels que le repliement, la maturation et la fonction de CFTR. Cependant, les rôles de ces domaines de manière individuelle dans la biogenèse, le repliement, la maturation, la fonction et la stabilité membranaire de CFTR restent inconnus.

Dans le but de préciser ceux-ci, nous avons étudié le comportement intracellulaire de protéines CFTR génétiquement modifiées. Nos résultats ont confirmé que contrairement à NBD2, NBD1 est essentiel pour la maturation et le trafic de CFTR vers la membrane plasmique. Bien que NBD2 ne soit pas important pour le repliement de la protéine, nous avons montré pour la première fois que celui-ci était nécessaire pour la stabilité de CFTR à la membrane plasmique. Nous avons montré que le 6^{ème} segment transmembranaire de TMD1 n'est pas stable dans la membrane plasmique et doit être important pour le repliement de la protéine, sans doute par son implication dans l'interaction entre les TMDs.

L'ensemble de ces résultats confirme aussi l'importance des interactions interdomaines dans le comportement cellulaire de la protéine CFTR.

Mots clefs : CFTR, NBD, TMD, maturation, stabilité, domaine, interaction.

Summary :

Deletion of Phe-508 (Δ F508) in the NBD1 of CFTR, an ABC chloride channel protein, causes its retention in the endoplasmic reticulum (ER) by preventing its conformational maturation without altering profoundly the local structure of NBD1, but possibly by disrupting the interaction between NBD1, NBD2, TMD1 and/or TMD2. However, the individual role of each domain in biogenesis, folding, maturation and membrane stability of a full length CFTR is still under debate. Using biochemistry, molecular and cellular biology methods, we demonstrate for the first time that each CFTR domain has a specific role. Our results showed that intact NBD1 at its N-terminal position is important in maturation and folding processes compared to NBD2 that was mandatory for CFTR function and membrane stability. The later was not affected by the CFTR folding state. Finally, TMD1 transmembrane segment 6 (S6) did not affect CFTR lipid bilayer orientation but did stop its maturation, suggesting the implication of S6 in CFTR domains interaction that is necessary for its normal cellular behaviour. Together, our results showed that CFTR folding is tightly depending on its domains interaction.

Key words: CFTR, NBD, TMD, maturation, stability, domain, interaction.

LABORATOIRE DE CHIMIE ET BIOLOGIE DES METAUX UMR 5249

Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant

Commissariat à l'Energie Atomique CEA-Grenoble